

Untersuchungen zur biotechnischen Methionin-Produktion in  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032:  
Entwicklung einer Screening-Strategie

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

Von Tanja Silke Hartwich  
aus Wolfenbüttel

1. Referent: Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop  
2. Referent: apl. Professor Dr. Siegmund Lang  
eingereicht am: 09.01.2008  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.05.2008

Druckjahr 2008

## ***Danksagung***

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Durch seine engagierte Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft hat er wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Siegmund Lang möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Willke für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die umfassende Unterstützung bei analytischen Fragestellungen.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Technologie der FAL Braunschweig für die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und das freundschaftliche Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biotechnol. Anja Kuenz, Frau Dipl.-Biotechnol. Claudia Wilkens, Frau Elena Geisler, Frau Dipl.-Ing. (FH) Susanne Hirschmann und Frau Dr. Milada Schubert für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung in Bonn, Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium nicht nur finanziell ermöglicht sondern mir mit wohlwollenden Worten den Weg gewiesen haben. Ich danke dafür, dass sie mir in allen Phasen der Arbeit mit konstruktiver Kritik zur Seite gestanden haben.

Schließlich danke ich meinem Mann Peter für das Verständnis und die Geduld, die er aufgebracht hat. Mit seiner besonnenen Art hat er für meine Ausgeglichenheit gesorgt und mir gezeigt, dass es auch ein Leben neben *Corynebacterium* gibt.

# *Inhaltsverzeichnis*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Taxonomie von <i>Corynebacterium glutamicum</i> und seine industrielle Bedeutung.....	1
1.2	Die essentielle Aminosäure L-Methionin.....	3
1.3	Die Methionin-Problematik im Ökolandbau.....	5
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>REVIEW DER LITERATUR.....</b>	<b>6</b>
3.1	Methionin-Biosynthese in <i>C. glutamicum</i> .....	6
3.2	Regulation der Methionin-Biosynthese in <i>C. glutamicum</i> .....	8
3.3	Produktion von Methionin.....	11
3.3.1	Chemische Synthese.....	11
3.3.2	Biotechnische Produktion.....	13
3.4	Methionin-Analoga-Selektionsstrategie.....	14
3.5	Screening- und Produktionsmedien .....	16
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
4.1	Bakterienstämme .....	19
4.1.1	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 (DSM 20300) .....	19
4.1.2	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 21608 .....	19
4.1.3	<i>Escherichia coli</i> B834 .....	19
4.2	Nährmedien.....	20
4.2.1	Medium 53.....	20
4.2.2	Medium Banik 74.....	20
4.2.3	Minimalmedium 1 (MM1).....	23
4.2.4	Minimalmedium 2 (MM2).....	25
4.2.5	MM2_2.....	27
4.2.6	MM2_3.....	27
4.3	Puffer und Lösungen .....	27

4.3.1	Lysispuffer.....	27
4.3.2	MOPS-Stammlösung.....	28
4.3.3	0,1 M Magnesiumsulfatlösung.....	28
4.3.4	Methionin-Standards in Wasser und Medium.....	28
4.3.5	Rinder-Serum-Albumin- (BSA-) Standards und Bradford-Reagenz .....	28
4.3.6	Lysozym-Stammlösung.....	29
4.3.7	Holzextrakt .....	29
<b>4.4</b>	<b>Geräte und sonstige Materialien.....</b>	<b>30</b>
4.4.1	Materialien.....	30
4.4.2	Kits.....	31
4.4.3	Geräte .....	31
<b>4.5</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>32</b>
4.5.1	Anzucht von Bakterien .....	32
4.5.2	Flüssigkultur .....	32
4.5.3	Stammkonservierung mittelfristig.....	34
4.5.4	Stammkonservierung langfristig .....	34
4.5.5	Bestimmung des Bakterientiters.....	35
4.5.6	Messung der optischen Dichte zur indirekten Biomasse-Bestimmung.....	35
4.5.7	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) .....	37
4.5.8	Bradford-Proteinbestimmung.....	38
4.5.9	Zellaufschluss von <i>C. glutamicum</i> .....	40
4.5.10	Gas-Chromatographie (GC) .....	41
4.5.11	UV-Mutation von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300.....	45
4.5.12	Mikrobiologischer Test mit <i>E. coli</i> B834 zum Methionin-Nachweis.....	48
4.5.13	Methionin-Analoga Selektion.....	49
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Medienoptimierung von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300.....</b>	<b>53</b>
5.1.1	B74-Medium.....	53
5.1.2	Entwicklung von MM1.....	56
5.1.3	Entwicklung von MM2.....	61
5.1.4	Optimale Wachstumsparameter für <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 im Reagenzglas und Kolben bei Einsatz von Medium MM2_2.....	68
5.1.5	Proteingehalt in <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in Abhängigkeit vom Medium .....	68
5.1.6	Bestimmung des Methionin-Gehalts in <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in Abhängigkeit vom eingesetzten Minimalmedium.....	72
<b>5.2</b>	<b>Methionin-Analoga und ihre Eignung für ein Screening nach Methionin-Überproduzenten.....</b>	<b>73</b>

5.2.1	Bestimmung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration.....	73
5.2.2	Hitzestabilität der eingesetzten Methionin-Analoga.....	76
5.2.3	Einfluss von Methionin auf die Hemmwirkung der eingesetzten Methionin-Analoga.....	80
5.2.4	Adaptation des Wildtyps <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 an verschiedene Konzentrationen von Methionin-Analoga.....	81
5.2.5	Vorselektion möglicher Methionin-Überproduzenten aus einem Pool von Mutanten mittels Methionin-Analoga-Resistenz .....	83
<b>5.3</b>	<b>Entwicklung eines Hochdurchsatzscreenings für Methionin mit Robotereignung.....</b>	<b>86</b>
5.3.1	UV-Mutation von DSM 20300 .....	86
5.3.2	Mikrobiologischer Methionin-Nachweis .....	87
5.3.3	Screening nach Methionin-Überproduzenten im Hochdurchsatz.....	127
5.3.4	GC-Analytik für Methionin und Optimierung .....	129
<b>5.4</b>	<b>Aminosäurespektren von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300, UV-Mutanten und ATCC 21608 .....</b>	<b>139</b>
5.4.1	Untersuchungen zur exponentiellen Phase.....	139
5.4.2	Untersuchungen zur stationären Phase .....	143
5.4.3	Momentaufnahmen des Aminosäurespektrums von ATCC 21608 in MM2_2 in der exponentiellen und stationären Phase.....	145
5.4.4	Untersuchung eines potenziellen industriellen Produktionsstamms für Met.....	147
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>154</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>156</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>163</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	163
9.2	Tabellenverzeichnis.....	168
<b>9.3</b>	<b>Kalibrierkurven und Tabellen <i>E. coli</i> B834 .....</b>	<b>170</b>
9.3.1	Kalibrierkurven im Reagenzglas-Maßstab.....	170
9.3.2	Kalibrierkurven und Tabellen im 96 well-Maßstab.....	171

## Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
AEC	L-Aminoethylcystein
Ala	Alanin
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP/ADP/AMP	Adenosin-tri/di/mono-Phosphat
B74	Medium Banik 74
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse [g/l]
CMN-Gruppe	Gruppe aus <i>Corynebacterium</i> – <i>Mycobacterium</i> – <i>Nocardia</i>
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EK	Einzelkolonie
EMSA	Electrophoretic mobility shift analysis
Eth	Ethionin, DL
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometer
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GRAS-Status	Generally Recognized As Safe-Status
Hom	Homoserin-Dehydrogenase
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HK	Hauptkultur
Hsk	Homoserinkinase
Ileu	Isoleucin
IS	Interner Standard Norvalin, EZ:faast-Kit
Lys	Lysin
LysC	Aspartat-Kinase
MA-Platte	Methionin-Analoga-haltige Agarplatte
McbR	Methionine and cysteine biosynthesis Regulator
Met	Methionin

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
MetB	Cystathionin-γ-Synthase
MetC	Cystathionin-β-Synthase
MetE	Vitamin B12-unabhängige Methionin-Synthase
MetH	Vitamin B12-abhängige Methionin-Synthase
MetK	SAM-Synthase
MetX	Homoserin-Acetyltransferase
MetY	O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase
MIK	Minimale Inhibitorische Konzentration
MM	Minimalmedium
NL	Norleucin, DL
OD	Optische Dichte, Extinktion [-]
RG	Reagenzglas
r bzw. R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient (Pearson-Korrelation) -1 bis +1
Rpm	Revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute
S	Schwefel
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
TZ	1, 2, 4-Triazol
$\bar{x}$	Arithmetisches Mittel; Mittelwert
Val	Valin
VK	Vorkultur



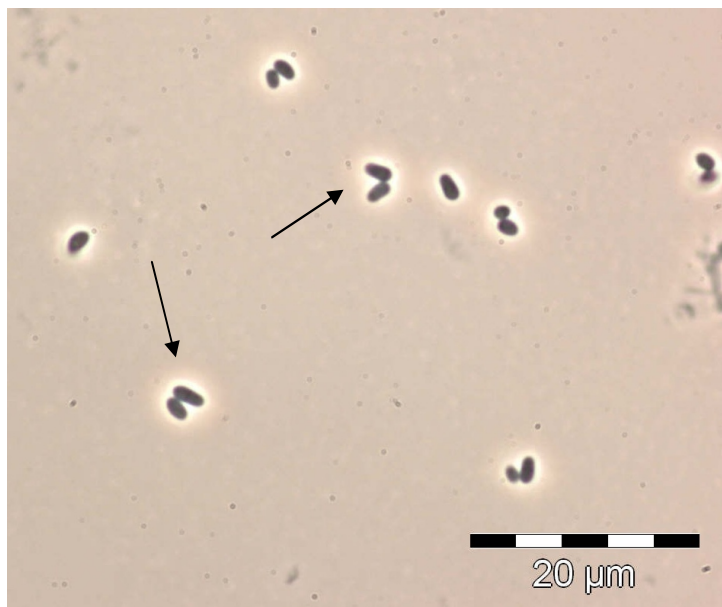
# 1 Einleitung

Die Aminosäureproduktion ist ein bedeutender Wirtschaftszweig mit steigender Tendenz. Innerhalb der letzten Jahre wurde die Produktion von L-Glutamat mit Hilfe von *Corynebacterium glutamicum* auf über 1.500.000 und die von L-Lysin auf 550.000 Jahrestonnen erhöht. L-Threonin wird mit Hilfe von rekombinanten *E. coli*-Stämmen fermentativ bei einer Jahresproduktion von 30.000 Tonnen gebildet. Dagegen wird D,L-Methionin chemisch synthetisiert (über 400.000 Jahrestonnen) (Hermann, T., 2003). Chemische und biotechnische Herstellungsverfahren stehen miteinander im Wettbewerb. Vorteil bei der fermentativen Aminosäureproduktion ist die selektive Herstellung des biologisch aktiven L-Stereoisomers. Weiterhin kann bei Einsatz von Mikroorganismen mit GRAS-Status (= Generally Recognized As Safe) die gesamte Biomasse als Futtermitteladditiv verfüttert werden. Eine zeit- und kostenintensive Aufreinigung des Produktes kann unterbleiben (Kirchner, M., 1998). Die biotechnische Herstellung von Aminosäuren kann die Bestimmungen und Gesetze zur Fleischproduktion im Ökolandbau einhalten und zusätzlich einen Beitrag zum Umweltschutz leisten, indem weite Transportwege für z.B. das Tier-Futtermittel Sojaschrot unterbleiben können. Aufgrund der enormen wirtschaftlichen Bedeutung von Aminosäuren besteht ein großes Interesse daran, optimierte Produktionsprozesse zu entwickeln. Wichtige Voraussetzung für die Messung des gewünschten Produktes ist eine geeignete Aminosäure-Analytik, die eine hohe Leistungsfähigkeit mit hohem Durchsatz ermöglicht und gleichzeitig das Produkt eindeutig und selektiv nachweist.

## 1.1 Die Taxonomie von *Corynebacterium glutamicum* und seine industrielle Bedeutung

Corynebakterien gehören taxonomisch gemäß Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Collins, M.D. and Cummings, C.S., 1986) der heterogenen Sektion der gram-positiven, nicht-sporulierenden Stäbchen mit irregulärer Form an. Es handelt sich um unbewegliche und fakultativ anaerobe Bakterien. Es gibt humanpathogene Spezies (*Corynebacterium diphtheriae*) und apathogene Bodenbakterien. Charakteristisch für die Gattung ist die sogenannte snapping division. Bei der Zellteilung kommt es zu einem Abwinkeln der Zellen, welches durch ein asymmetrisches Aufreißen der Zellwand entsteht (Abb. 1, S. 2). Der

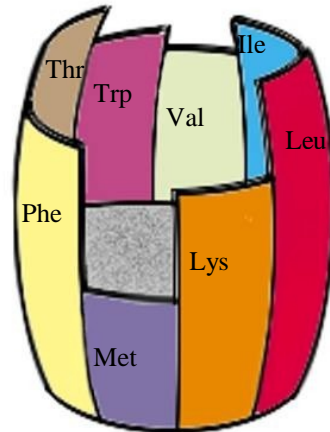
Gattungsname bezieht sich auf die Keulenform der Zellen (griechisch Koryne = Keule). Der hohe GC-Gehalt der DNA mit 51-65 mol % für Corynebakterien (Stackebrandt E. and Woese C.R., 1981) ist ein Merkmal für die Zugehörigkeit zur Actinomycetenunterfamilie. Die Zellwandzusammensetzung der Gattung *Corynebacterium* erfolgt über den Einsatz von meso-2,6-Diaminopimelat zur Quervernetzung des Peptidoglykans, den Zuckern Arabinose, Galactose und den Einbau kurzkettiger Mycolsäuren mit nur 22-36 C-Atomen. Über chemotaxonomische Untersuchungen der Lipid- und Zellwandzusammensetzung konnte eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu den Gattungen *Mycobacterium*, *Nocardia* und *Rhodococcus* nachgewiesen werden, was eine Zusammenfassung zur CMN-Gruppe (*Corynebacterium* – *Mycobacterium* – *Nocardia*) durch Barksdale zuließ (Barksdale, L., 1970). Die Gattung *Corynebacterium* verfügt über ein breites Spektrum an für den Menschen interessanten Stoffwechselleistungen, u. a. werden sie eingesetzt zur Produktion von Nukleotiden (Enei H. et al., 1985), Antibiotika (Suzuki T. et al., 1972) und vor allem L-Aminosäuren (Yamada K. et al., 1972). Schon im Jahr 1957 erlangte *Corynebacterium glutamicum* einige Popularität. Kinoshita entdeckte bei der Fermentation dieses Bakteriums größere Mengen an L-Glutamat im Kulturüberstand (Kinoshita, S. et al., 1957). Die Aminosäure Glutaminsäure war auch Namensgeber für das Bakterium. Heute zählt *Corynebacterium glutamicum* zu den bedeutendsten Mikroorganismen, die bei der biotechnischen Aminosäureproduktion Anwendung finden.



**Abb. 1:** Mikroskopische Aufnahme (Zeiss Axioplan) von *C. glutamicum* DSM20300 in 100facher Vergrößerung Ölimmersion; die Pfeile kennzeichnen Bildbereiche mit einer „snapping division“.

## 1.2 Die essentielle Aminosäure L-Methionin

Methionin wurde erstmals 1922 bei der Untersuchung von Proteinhydrolysaten der Gattung *Streptococcus* entdeckt. Man war auf der Suche nach wachstumsfördernden Substanzen (Mueller J.H., 1922). Zu den essentiellen Aminosäuren gehören neben Methionin auch Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Lysin und Threonin. Diese Aminosäuren können vom tierischen und menschlichen Körper nicht selbst synthetisiert werden und müssen mit der Nahrung aufgenommen werden. Pflanzen und Mikroorganismen können dagegen über verschiedene Stoffwechsel- und Synthesewege alle Aminosäuren selbst produzieren. Obwohl der Methionin-Gehalt in Proteinen gering ist, spielt diese Aminosäure eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel. Neben der Funktion bei der Proteinsynthese fungiert Methionin in Form von S-Adenosylmethionin als Hauptmethylgruppendonor (Cantoni, G.L., 1953). Bei Prokaryoten ist N-Formylmethionin der Initiationsfaktor der Translation (Adams, J.M. and Capecchi, M.R., 1966). In der Tiermast (Schweine- und Geflügelzucht) werden Aminosäuren als Futtermitteladditive eingesetzt. Pflanzliche Futtermittel, wie z.B. Getreide, Sojabohnen (geschrotet), Mais und Reis sind allerdings arm an Methionin, Lysin und Threonin. Tierische Aminosäurequellen wären Tier- und Fischmehle, die aber wegen verschiedener Krankheitserreger (u. a. BSE) umstritten und mittlerweile verboten sind. Die natürlichen Aminosäurequellen haben einen gemeinsamen und entscheidenden Nachteil: der Gehalt von Aminosäuren schwankt je nach Umweltbedingungen. In Geflügelfutter auf Sojabasis sind meist die Schwefel-haltigen Aminosäuren Methionin und Cystein erstlimitierend. Der hohe Bedarf des Geflügels an diesen Aminosäuren erklärt sich vor allem durch den Aufbau des Gefieders. In der Schweinemast mit Futter auf Weizen-Basis ist das Lysin erstlimitierend. Das Liebig'sche Fass stellt z.B. den Nährwert von Sojabohnenmehl dar (Abb. 2, S. 4). Der Füllungsgrad des Fasses beschreibt das Proteinsynthesevermögen des gefütterten Tieres, also wie gut das gesamte Futter verwertet und in gutes Wachstum umgesetzt werden kann. Die kürzeste Daube, die für die Aminosäure Methionin steht, begrenzt das Fassungsvermögen des gesamten Fasses, d. h. wenn es an Methionin mangelt, so können auch alle anderen im Überschuss gefütterten Aminosäuren nicht vom Tier verwertet werden.



**Abb. 2:** Liebig'sches Fass. Darstellung des Nährwertes von Sojabohnenmehl. L-Methionin ist die erstlimitierende Aminosäure; verändert nach (Deutenberg, D., 2003).

Ein Überschuss an Aminosäuren wird abgebaut und ausgeschieden, was den Stickstoffanteil der Exkremente stark erhöht und damit die Umwelt belastet (Kircher, M. and Leuchtenberger, W., 1998). Auch ist der Import von Sojaschrot aus Entwicklungsländern wegen der langen Transportwege und der damit einhergehenden CO<sub>2</sub>-Emission in die Atmosphäre umstritten. Besser ist eine gezielte und genau aufs Tier abgestimmte Zudosierung von Aminosäuren zum Tierfutter zur Minimierung der Stickstoff- und CO<sub>2</sub>-Belastung der Umwelt. Die Vorteile bei der biotechnischen Herstellung von Aminosäuren bestehen darin, dass die Ausgangssubstrate nachwachsende Rohstoffe wie Zucker und Stärkehydrolysate, einfache Stickstoff- und Schwefel-Verbindungen sind. Darüber hinaus sind die Rückstände einer Fermentation biologisch abbaubar. Derzeit sind *Corynebacterium glutamicum* und *Escherichia coli* die bedeutendsten Organismen zur großtechnischen Herstellung von Glutamat und Lysin (Eggeling, L. and Sahm, H., 1999). Glutamat wird in der Lebensmittelindustrie als Geschmacksverstärker eingesetzt, Lysin findet als Futtermitteladditiv in der Tierernährung Anwendung. DL-Methionin wird chemisch in großtechnischem Maßstab synthetisiert (Leuchtenberger W., 1996).

### 1.3 Die Methionin-Problematik im Ökolandbau

Bei der Fleischproduktion im Ökolandbau besteht durch eine im August 2005 in Kraft getretene EG-Vorordnung (EWG Nr. 2092/91) ein Verbot der Zufütterung von synthetisch produzierten Aminosäuren, wie Methionin. Auch die Zufuhr von importiertem Sojaschrot steht nicht im Einklang mit den Prinzipien des Ökologischen Landbaus. Eine alternative biotechnische Herstellung von L-Methionin auf ökologischer Basis ohne den Einsatz von Gentechnik wird angestrebt. Biotechnisch synthetisiertes Methionin würde vor allem dann den Forderungen des Ökolandbaus gerecht werden, wenn die gesamte Biomasse des Methionin-produzierenden Organismus mit GRAS-Status verfüttert werden könnte. *Corynebacterium glutamicum* ist dafür ein vielversprechender Kandidat. Mikroorganismen können L-Methionin für ihren eigenen Bedarf synthetisieren. Da Methionin in Bezug auf ATP- (Energieäquivalent) und NADPH + H<sup>+</sup> - (Reduktionsäquivalent) Kosten zu den „teuersten“ Aminosäuren des mikrobiellen Stoffwechsels zählt, wird ein Wildtyp-Stamm sein Methionin nicht in Form einer energetisch ungünstigen Methionin-Überproduktion „verschwenden“. Daher unterliegt besonders die Methionin-Biosynthese einem strengen Netzwerk von Regulation zur Vermeidung von Überproduktion. Zufallsmutagenese könnte ein Weg sein, um einen Methionin-Überproduzenten zu gewinnen. Verschiedene wissenschaftliche Arbeiten zur mikrobiologischen Methionin-Produktion weisen auf eine Ergiebigkeit regulatorischer Methionin-Analoga-resistenter und auxotropher Mutanten hin.

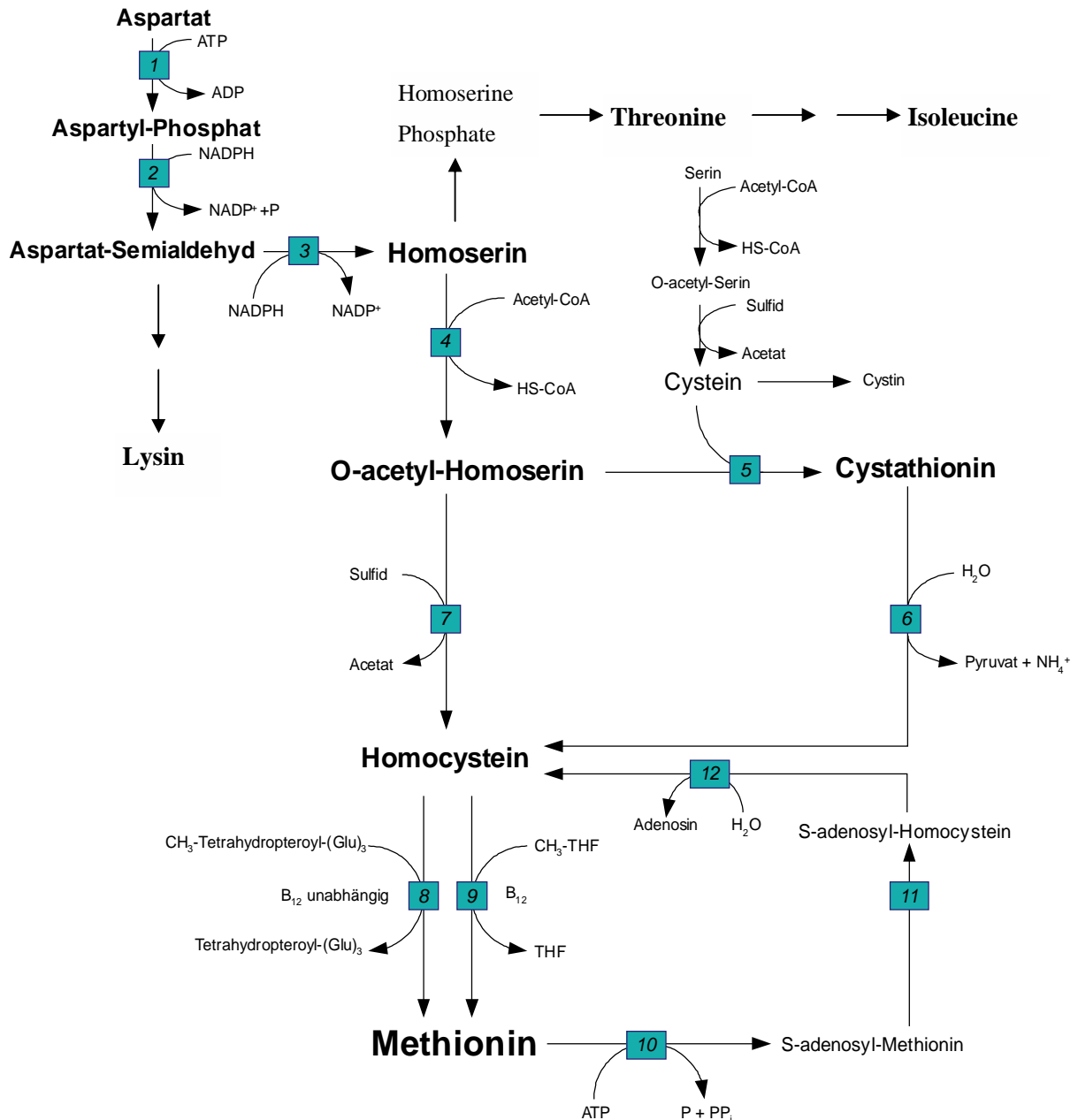
## 2 Zielsetzung

Innerhalb der Erforschung der biotechnischen Methionin-Produktion ist eine schnelle und zugleich zuverlässige Analytik noch immer problematisch. Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die die Chance für das Auffinden eines Methionin-Überproduzenten erhöht. Die Methode sollte ein Hochdurchsatzscreening bei geringem Kosten- und Zeitaufwand innerhalb einer *C. glutamicum* -Population ermöglichen mit der Option, einen Screeningroboter einzusetzen. Ein schnelles und kostengünstiges Vorscreening qualitativer Art sollte von einer zuverlässigen abschließenden quantitativen Analytik gestützt werden.

## 3 Review der Literatur

### 3.1 Methionin-Biosynthese in *C. glutamicum*

Die Methionin-Biosynthese in *C. glutamicum* ist vollständig aufgeklärt (Rückert C., 2001); sie wurde auch in verschiedenen anderen Organismen untersucht. Es wurden Ähnlichkeiten und Unterschiede gefunden. Ähnlich verläuft der Weg bis zu dem Zwischenprodukt O-Acetyl-L-Homoserin. Erst anschließend gibt es zwei mögliche Wege zur Bildung von L-Homocystein: Die direkte Sulfhydrierung und die Transsulfuration. Charakteristisch für *E. coli* ist die Transsulfuration. Organismen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizobium etli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Leptospira meyeri* gehen den Weg der direkten Sulfhydrierung. Während Hefen, Pilze und grüne Pflanzen beide Biosynthesewege für Methionin aufweisen, ist es für Prokaryoten eher ungewöhnlich. Bei *C. glutamicum* wurden parallel beide Wege entdeckt, die von unabhängig arbeitenden Enzymen katalysiert werden, wobei die Sulfhydrierung einen sehr viel höheren Energiebedarf hat als der alternative Weg der Transsulfuration (Hwang, B.J. et al., 2002). Dies weist auf eine metabolische Flexibilität und effiziente Anpassung der Organismen an ihre Umwelt hin. Die Synthese der zur Aspartat-Familie gehörigen Aminosäure Methionin geht in *C. glutamicum* von Aspartat aus (Abb. 3, S.7). Die anderen Mitglieder der Aspartat-Familie sind die Aminosäuren Lysin, Threonin und Isoleucin. Die Aspartat-Kinase (= LysC) ist das erste Enzym der Methionin-Biosynthese und katalysiert unter ATP-Verbrauch die Phosphorylierung von Aspartat zu 4-Aspartylphosphat (Schritt 1 Abb. 3, S. 7). Eine Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von 4-Aspartylphosphat unter NADPH-Oxidation zu L-Aspartatsemialdehyd und Phosphat (Schritt 2 Abb. 3, S. 7). Aspartatsemialdehyd ist eine Verzweigungsstelle für die Lysin- und Homoserin-Biosynthese, während von Homoserin ein Weg zum Methionin und ein anderer zu Threonin und Isoleucin führt. Eine Homoserin-Dehydrogenase (= Hom) katalysiert unter NADPH-Oxidation die Reaktion von L-Aspartatsemialdehyd zu L-Homoserin (Schritt 3 Abb. 3, S. 7). Eine Homoserin-Acetyltransferase (= MetX) katalysiert die Aktivierung von L-Homoserin zu O-Acetyl-L-Homoserin, wobei ein Acetyl-CoA verbraucht und HS-CoA reduziert wird (Schritt 4 Abb. 3, S. 7) (Lee, H.S. and Hwang, B.J., 2003).



**Abb. 3:** Methionin-Biosynthese und Abbau durch Transmethylierungen in *C. glutamicum* verändert nach Krömer (Krömer, J.O., 2006); Beteiligte Enzyme: (1) LysC ; (2) Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase ; (3) Hom ; (4) MetX ; (5) MetB ; (6) MetC ; (7) MetY ; (8) MetE ; (9) MetH ; (10) MetK ; (11) 5-Cytosin-Methyltransferase ; (12) Adenosyl-Homocysteinase.

Von hier aus gibt es zwei alternative Wege zum aktivierten L-Homocystein. Bei der direkten Sulfhydrierung (Schritt 7 Abb. 3, S. 7) bildet eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrolase (= MetY) unter Einbau von Sulfid (anorganische Schwefelquelle) und Abspaltung von Acetat aktives L-Homocystein (Hwang, B.J. et al., 2002). Der alternative Weg ist die

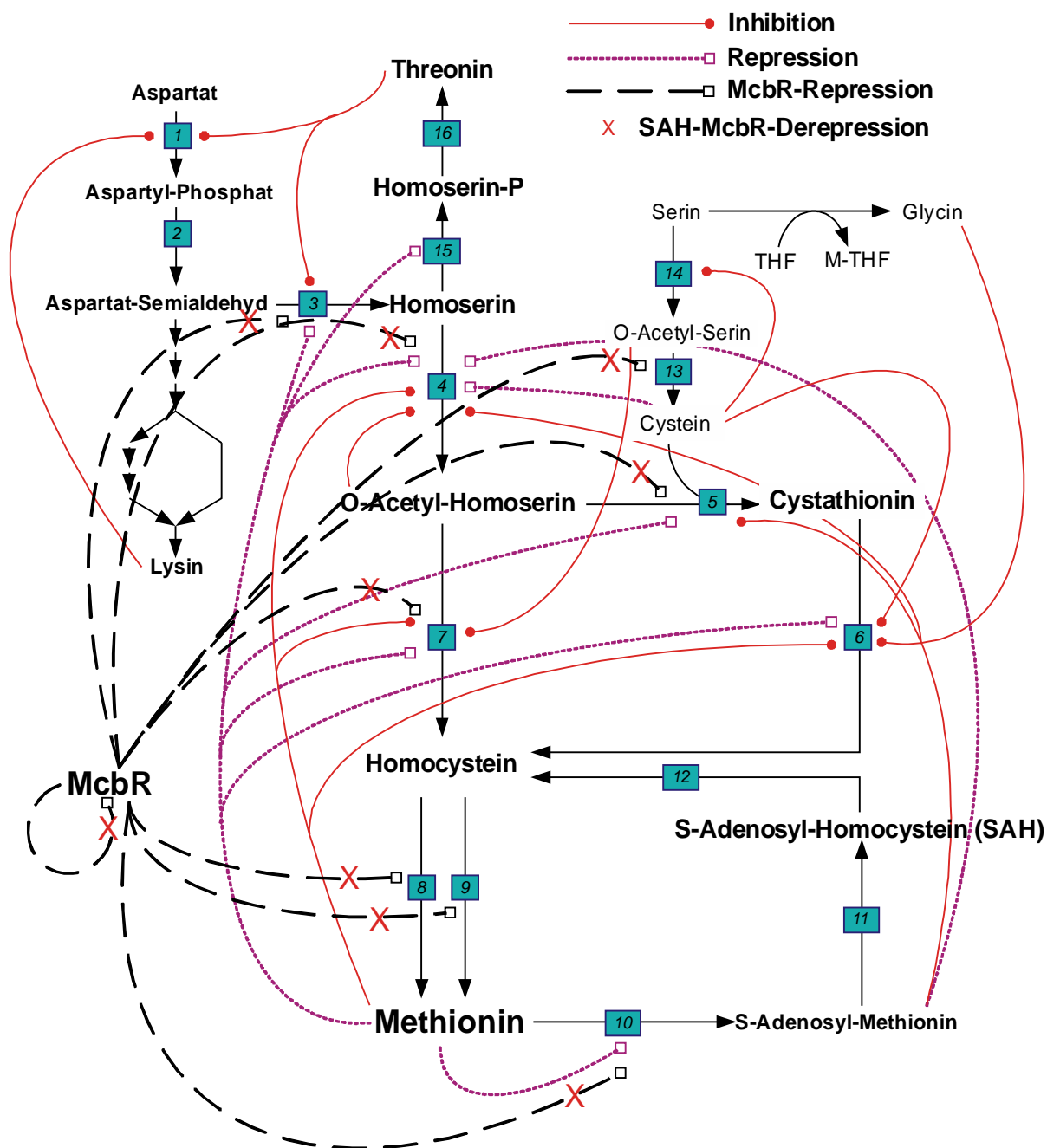
Transsulfuration (Schritt 5 und 6 Abb. 3, S. 7), bei der O-Acetyl-L-Homoserin von der Cystathionin- $\gamma$ -Synthase (= MetB); (Hwang, B.J. et al., 1999) unter Cysteineinbau (Cystein als organische Schwefelquelle) zu Cystathionin umgesetzt wird und anschließend hydrolytisch durch die Cystathionin- $\beta$ -Lyase (= MetC) zu L-Homocystein, Pyruvat und Ammonium gespalten wird (Hwang, B.J. et al., 1999; Kim, J.W. et al., 2001). Die Transsulfuration ist ein wesentlicher Schritt im Methionin-Homocystein-Stoffwechsel. Die Enzyme MetE (Schritt 8 Abb. 3, S. 7; Vitamin B12 unabhängige Methionin-Synthase) und MetH (Schritt 9 Abb. 3, S. 7; Vitamin B12 abhängige Methionin-Synthase) katalysieren den letzten Schritt der Methionin-Biosynthese, in dem L-Homocystein zu Methionin methyliert wird (Remethylierung). In der Proteinbiosynthese (Anabolismus) wird das gebildete Methionin verbraucht oder durch die SAM-Synthase (= MetK) unter ATP-Verbrauch zu S-Adenosyl-Methionin (=SAM) und Phosphat gespalten (Schritt 10 Abb. 3, S. 7; Katabolismus). Die hochreaktive Methylgruppe dieses Sulfonium-Ions macht SAM zum Hauptmethylgruppendonor der Zelle. Die Methylgruppe kann von SAM auf den Akzeptor S-Adenosyl-Homocystein (=SAH) übertragen werden (Schritt 11 Abb. 3, S. 7; Transmethylierung). In der nächsten Reaktion des Methioninabbaus wird SAH durch die Adenosyl-Homocysteinase zu Homocystein und Adenosin hydrolysiert (Schritt 12 Abb. 3, S. 7). Bei erhöhten Konzentrationen an Homocystein kann sich SAH vermehrt zurückstauen und beeinflusst die Methyltransferasen negativ.

### **3.2 Regulation der Methionin-Biosynthese in *C. glutamicum***

Die Regulation der Methionin-Biosynthese ist teilweise aufgeklärt und findet sowohl auf Protein- wie auch auf Genomebene statt (Abb. 4, S. 10). Die Regulation der Genexpression und der Enzymaktivität ist eng verbunden mit der Schwefelassimilation. Auf Proteinebene sind die Intermediate des Methionin-Stoffwechsels O-Acetylhomoserin, SAM sowie die Aminosäuren Lysin, Threonin, Glycin und Cystein an der Regulation ihrer Synthese und der Methionin-Synthese beteiligt. Auch Methionin selbst inhibiert die O-Acetyltransferase und die O-Acetylhomoserin-Sulphydrolase. Zum einen wird durch diese Art der Regulation eine angemessene Bereitstellung von Aminosäuren garantiert, zum anderen wird eine Akkumulation von Homocystein vermieden (Krömer, J.O., 2006). Auf Genomebene der Regulation der Methionin-Biosynthese nimmt das Repressorprotein McbR (= Methionine and cysteine biosynthesis Regulator) zusammen mit seinem Effektor S-Adenosylhomocystein



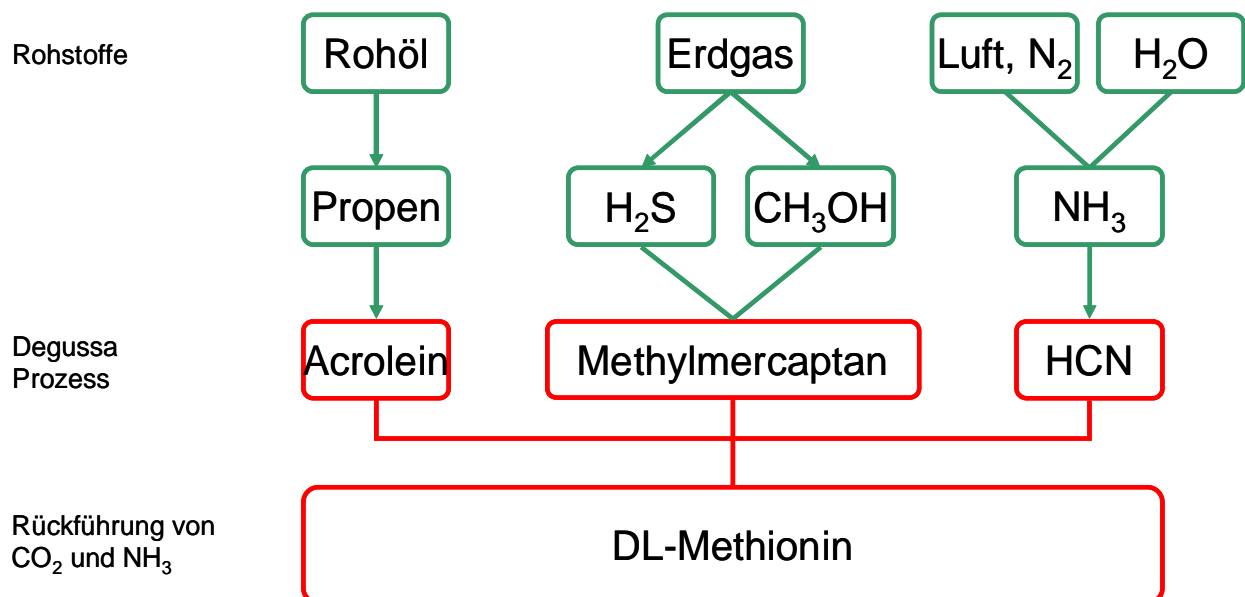
(= SAH) einen hohen Stellenwert ein. McbR kontrolliert die Expression der Gene der Methionin-Biosynthese *hom*, *metA*, *metB*, *metY*, *metE*, *metH*, *metK*, daneben reguliert es auch die Synthese von Cystein (Rey, D.A. et al., 2005). Es scheint ein hierarchisches Regulationsnetzwerk mit McbR als Oberregulator zu geben mit wahrscheinlich zwei weiteren potenziellen Regulatoren auf Ebene der hochregulierten Gene (Rey, D.A. et al., 2005). Erst kürzlich wurde ein weiterer möglicher Repressor innerhalb des Cystein-Stoffwechsels entdeckt, der das *cys*-Operon und noch einige weitere Gene reprimiert. Das McbR-Regulon kann in fünf funktionale Cluster unterteilt werden, einschließlich 45 Genen, die direkt vom McbR Repressor kontrolliert werden. Diese 45 Gene codieren für eine Vielfalt an Funktionen in der SAM- und Cystein-Biosynthese, in der Sulfatreduktion, in der Aufnahme und Verwertung von Schwefel-enthaltenden Verbindungen (Schwefel-Transport und Schwefel-Metabolismus) und in der transkriptionellen Regulation (Rey, D.A. et al., 2005). Arbeiten von Hüser 2003 und Kalinowski 2003 (DNA microarray und Genomsequenz von *C. glutamicum*) waren die Grundlage zur Festlegung der Grenzen des durch das McbR Proteins kontrollierten Regelnetzwerkes (Hüser, A.T. et al., 2003; Kalinowski, J. et al., 2003). Eine systematische Suche nach dem Effektor von McbR identifizierte SAH mit Hilfe der EMSA (= Electrophoretic mobility shift analysis). Eine steigende Konzentration an SAH führt zu einer Beeinträchtigung der Bindung von McbR an der Ziel-DNA. SAH ist Teil der zyklischen Schwefel-Verwertung und kann nach Hydrolyse in Form von Homocystein als Vorstufe für die Methionin-Biosynthese dienen. SAH und SAM sind über die Rate der Transmethylierungsreaktionen physiologisch miteinander verbunden. Das McbR Protein beeinflusst das zelluläre SAH-Level, was direkt den Verbrauch an SAM widerspiegelt. Ein ausbalanciertes Niveau an SAM ist nötig für viele zelluläre Abläufe, die mit dem optimalen Wachstum der Organismen zu tun haben, z.B. konnte in *E. coli* gezeigt werden, dass ein niedriges SAM-Level in einer fehlerhaften Zellteilung resultiert (Newman, E.B. et al., 1998). Bezüglich einer genetischen Optimierung der Methionin-Biosynthese in *C. glutamicum* erscheint ein Knockout des Regulatorproteins McbR als ein vielversprechender Ansatz (Rey, D.A. et al., 2005).



### 3.3 Produktion von Methionin

#### 3.3.1 Chemische Synthese

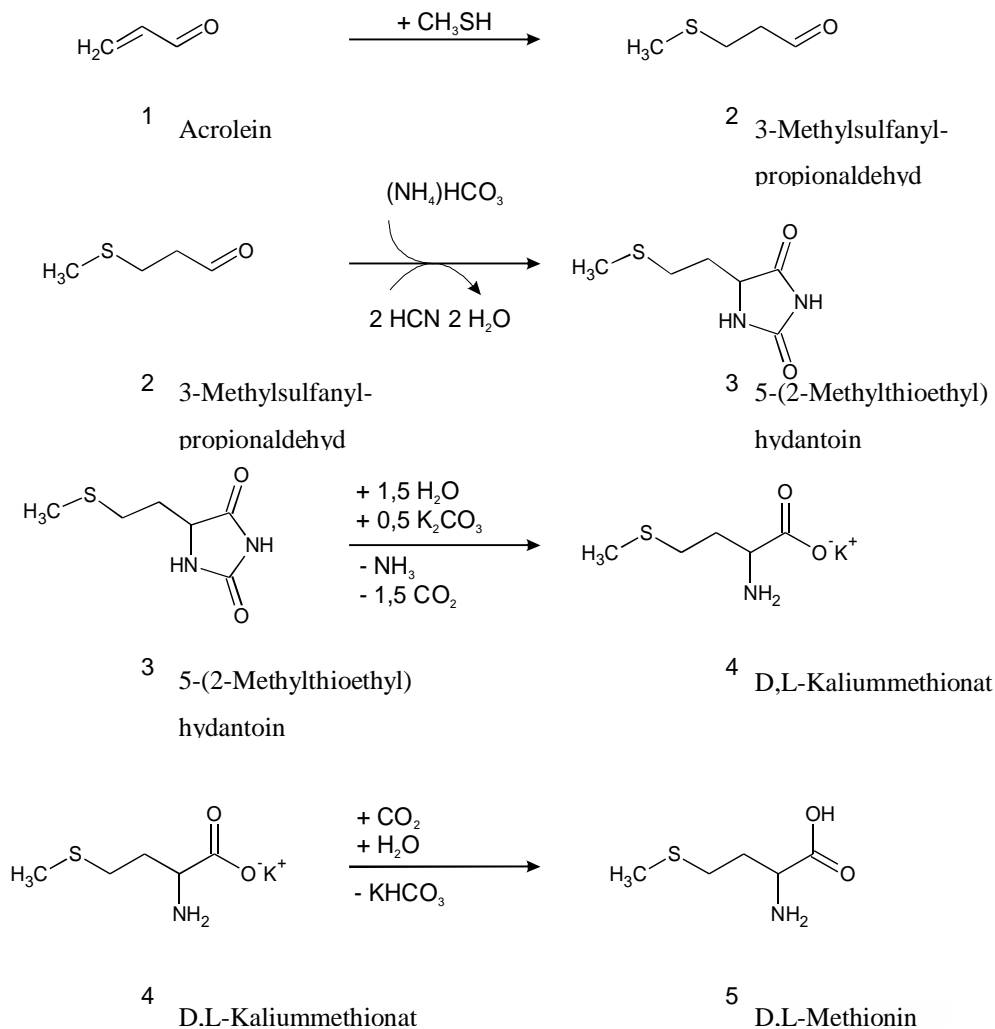
Das Degussa-Verfahren stellt derzeit mit einer Ausbeute von 95 % die einzig wirtschaftliche Möglichkeit der Methionin-Synthese dar (Lüssling T. et al., 1974). Aus den petrochemischen Ausgangsstoffen Rohöl und Erdgas wird zusammen mit Blausäure in einem mehrstufigen Verfahren DL-Methionin hergestellt (Abb. 5, S. 11). Das Racemat ist als Futtermittelzusatz geeignet, da Enzyme im Körper vorliegen, die aus der D- die L-Form herstellen; eine pharmazeutische Anwendung ist allerdings nur mit der reinen L-Form möglich, wofür die DL-Form enzymatisch in die L-Form überführt wird (Chibata J. et al., 1976).



**Abb. 5:** Methionin-Synthese nach dem Degussa-Verfahren 1 (Pack, M., 2004)

Rohöl, Erdgas und Luft liefern die Ausgangssubstanzen für die Methionin-Synthese nach dem Degussa-Verfahren (Abb. 5, S. 11). *Rohöl*, ein lipophiles in der Erdkruste eingelagertes Stoffgemisch aus Kohlenwasserstoffen (u. a. Methan) liefert das *Propen* (ein farbloses, brennbares Gas). Es wird durch thermische Spaltung von bei der Erdölverarbeitung anfallenden Benzinen erhalten und stellt einen der wichtigsten Grundstoffe der chemischen Industrie dar. Propen dient der Herstellung zahlreicher Folgeprodukte: *Acrolein*, Aceton, Acrylnitril, Acrylsäure, Allylverbindungen, Polypropylen, Propylenoxid und Propylenglykol.

*Erdgas* ist ein unterirdisch vorkommendes brennbares Naturgas, ein Gasgemisch, dessen chemische Zusammensetzung je nach Fundstätte beträchtlich schwankt. Der Hauptbestandteil Methan, aus dem Methanol gewonnen wird, dient zusammen mit dem Nebenbestandteil Schwefelwasserstoff der Bildung von Methylmercaptan (=Methanthiol). Für die Ammoniaksynthese nach dem Haber-Bosch-Verfahren wird der Luftstickstoff und Wasserstoff aus dem Methangas eingesetzt. Bei der Ammondehydrierung von Methan (Degussa-BMA-Verfahren) werden Ammoniak und Methan mit Hilfe eines Katalysators zu Blausäure und Wasserstoff umgesetzt.



**Abb. 6:** Methionin-Synthese nach dem Degussa-Verfahren 2 (Wagner, H. et al., 1969); Erläuterung im Text

Die chemische Methionin-Synthese ist in Abb. 6 auf S. 12 genauer dargestellt. Aus Acrolein (1) und Methanthiol wird 3-Methylsulfanylpropionaldehyd (2) hergestellt, der mit Blausäure und Ammoniumbicarbonat (= Ammoniumhydrogencarbonat) zu 5-(2-Methylthioethyl)hydantoin (3) reagiert. 3 wird mit einem Überschuss an Kaliumcarbonat in alkalischer Lösung bei 170 °C hydrolysiert. Es entstehen neben D,L-Kaliummethionat (4) auch CO<sub>2</sub> und Ammoniak, aus denen Ammoniumbicarbonat für die zweite Stufe zurückgewonnen wird. Durch Einpressen von CO<sub>2</sub> wird die Kaliummethionat-Lösung angesäuert und D,L-Methionin (5) und Kaliumhydrogencarbonat werden freigesetzt. Letzteres wird durch Erhitzen und Konzentrieren in CO<sub>2</sub> und Kaliumcarbonat zersetzt, das wieder in der Hydantoinhydrolyse eingesetzt wird (Hauer, B. et al., 2004).

### 3.3.2 Biotechnische Produktion

Gegenwärtig ist kein Mikroorganismus bekannt, der L-Methionin natürlich überproduziert (Kumar, D. et al., 2005). Eine biotechnische Produktion wird zwar angestrebt, scheitert aber bislang an fehlenden Produktionsstämmen. Die meisten der in der Industrie eingesetzten Aminosäuren werden durch regulatorische Mutanten produziert. Auch auxotrophe Mutanten können Aminosäuren überproduzieren. Die klassische Form ist die ungerichtete Mutagenese mit Hilfe von UV-Strahlung und chemischen Mutagenen (u. a. Methionin-Strukturanaloga). Im Fall der UV-Licht induzierten Mutagenese wären die entstandenen Mutanten gemäß dem Gentechnikgesetz keine transgenen Organismen. Ihr Einsatz für Zwecke im Ökolandbau wäre vertretbar. Nachteile der klassischen Mutagenese liegen in der Anhäufung unerwünschter Mutationen im Genom, welche keinen Fortschritt hinsichtlich der gewünschten Aminosäureproduktion mit sich bringen. Die Fitness der Zellen wird geschwächt. Durch die stark verzweigte Regulation der Methionin-Biosynthese erscheint ein rationales Vorgehen zur Optimierung der Methioninproduktion in *C. glutamicum* sinnvoller als die klassische Mutagenese; unter rationalem Stammdesign versteht man den gezielten Einsatz von Gentechnik. Die Ergebnisse dieser Methode sind aber nicht für den Einsatz im Ökolandbau geeignet. Durch vergleichende Genomanalysen ist es möglich, negative von positiven Mutationen zu unterscheiden. Ein gezieltes Ausschalten von Regulatoren und eine gezielte Veränderung bestimmter Gene sollte eine Steigerung der Methionin-Produktion möglich machen. Um die zukünftige biotechnische Anwendung von *C. glutamicum* für die Methionin-Produktion zu ermöglichen, war die Aufklärung des Biosyntheseweges von Methionin und

seiner Regulation im letzten Jahrzehnt Objekt intensiver Forschung (Hwang, B.J. et al., 1999; Kim, J.W. et al., 2001; Park, S.D. et al., 1998; Rossol, I. and Puhler, A., 1992; Rückert C., 2001). Sowohl die klassische Mutagenese als auch rationales Stammdesign weisen Schwächen auf, die besonders im methodischen Bereich liegen. Bei ungerichteter Mutagenese muss die Identifikation der brauchbaren von den nicht brauchbaren Klonen phänotypisch z.B. über Methionin-Analoga-Selektion erfolgen; es handelt sich um eine zeitaufwendige Prozedur. Zur Gewinnung transgener Methionin-Produzenten muss der Methionin-Stoffwechselweg bekannt und seine Regulation verstanden sein, insbesondere um die Rangfolge der bedeutendsten Positionen im Genom für einen gentechnischen Eingriff zu identifizieren; die Selektion der nicht interessanten Mutanten entfällt in diesem Fall (Kalinowski, J. et al., 2003). Trotz aller bisherigen Schwierigkeiten weist *C. glutamicum* mit dem Vorhandensein der parallelen Biosynthesewege Transsulfuration und direkte Sulfhydrierung eine Flexibilität auf, die ein idealer Ausgangspunkt für die Manipulation und Konstruktion von Methionin-überproduzierenden Stämmen zu sein scheint (Lee, H.S. and Hwang, B.J., 2003). Die genetische Konstruktion eines Methionin-überproduzierenden *C. glutamicum*-Stammes stellt eine leistungsfähige Alternative zur klassischen Mutagenese dar (Sahm, H. et al., 1995; Sahm, H. et al., 2000).

### **3.4 Methionin-Analoga-Selektionsstrategie**

Die Erfolge hinsichtlich des Einsatzes von Strukturanaloga mit dem Ziel der Aufhebung der Regulation z.B. innerhalb der Lysin-Biosynthese lassen sich nicht so einfach auf die Methionin-Biosynthese übertragen. Lysin ist das Endprodukt eines Stoffwechselweges; es war möglich, durch den Einsatz von L-Aminoethylcystein (= AEC) ein feedback-resistentes LysC zu erzeugen, was zu einer Lysin-Überproduktion führte (Ohnishi, J. et al., 2002). Der Methioninstoffwechsel endet nicht mit Methionin, der inkorporierte Schwefel ist energetisch für die Zelle so wertvoll, dass ein Zuviel an Methionin zu S-Adenosyl-Methionin (=SAM) umgewandelt wird. Neben einer Kontrolle durch feedback-Inhibition kontrolliert der Repressor McbR die Methionin-Biosynthese. Trotzdem ist in der Literatur von Erfolgen beim Einsatz von Methionin-Analoga bezüglich des Auffindens von Methionin-Überproduzenten in verschiedenen Mikroorganismen die Rede (Gomes, J. and Kumar, D., 2005; Kumar, D. and Gomes, J., 2005). Aminosäure-Analoga fungieren als feedback-Inhibitoren, ohne eine andere brauchbare Funktion in der Zelle einzunehmen (Chattapadhyay, M.K. et al., 1995). Mutanten,

die eine Resistenz gegen Analoga aufweisen, haben veränderte und deregulierte Enzyme. Dies kann bei Abwesenheit des Analogons zu einer Überproduktion der korrespondierenden Aminosäure mit Exkretion ins Medium führen (Kase, H. and Nakayama, K., 1975b). Früher war die geläufige Meinung, dass Aminosäure-Analoga das Wachstum von Zellen inhibieren, weil sie anstelle der korrespondierenden Aminosäure in Proteine eingebaut werden und somit keine funktionalen Proteine gebildet werden können. Dies kann zwar in einigen Fällen vorkommen, aber der häufigere Grund für die Hemmung durch Analoga besteht darin, dass Aminosäure-Analoga den Stoffwechselweg imitieren, über den die Aminosäure üblicherweise die eigene Synthese reguliert. Analoga können an die allosterische oder die Produkt-Seite des Enzyms binden oder sie binden an den zugehörigen Repressor, so dass der Biosyntheseweg für die spezielle Aminosäure abgeschaltet wird. Analoga hemmen also als Pseudo-feedback-Inhibitor das Wachstum von Zellen, indem die Zelle an einer bestimmten Aminosäure ausgehungert wird. Nur Analoga-resistente Mutanten können in Anwesenheit des Analogons wachsen mit z. T. einhergehender Überproduktion der korrespondierenden Aminosäure (Kumar, D. and Gomes, J., 2005; Sharma, S., 2001). Kumar beschreibt in seiner Arbeit 4 mögliche Varianten, wie eine Analogon-Resistenz entstehen kann: (1) durch die Mutation in einem Operator, der zu einer Aufhebung der Hemmung biosynthetischer Enzyme führt; (2) durch Mutation in einem strukturellen Gen eines Biosyntheseenzym, das einer Endprodukt-Inhibierung unterworfen ist, woraus der Verlust einer feedback Kontrolle resultiert; (3) durch Mutation in einem strukturellen Gen des Enzyms Aminoacyltransfer-RNA-Synthase, was zu einer Abgrenzung zwischen der Aminosäure und seinem Analogon führt; und (4) durch Mutation in einem strukturellen Gen der Permease einer Aminosäure, was in einer reduzierten Fähigkeit zur Aufnahme des entsprechenden Analogons führt (Kumar, D. and Gomes, J., 2005). Untersuchungen zur biotechnischen Lysin- und Threonin-Überproduktion belegen, dass regulatorischen Mutanten von *C. glutamicum*, die gleichzeitig eine Auxotrophie aufweisen, mehr Aminosäure bilden als ohne Vorliegen einer Auxotrophie. Im Falle der Übertragbarkeit auf die Methionin-Biosynthese wäre das Vorliegen einer Lysin- und Threonin-Auxotrophie im Zusammenhang mit einer Methionin-Analoga-Resistenz die ideale Ausgangsposition für eine Methionin-Überproduktion, da einerseits keine Hemmung der Enzyme Aspartat-Kinase und Homoserindehydrogenase durch Lysin und Threonin, und andererseits keine Verschwendung von Kohlenstoff für die Bildung dieser beiden Metabolite vorliegt. Außerdem sollte die Mutante insensitiv gegenüber einer feedback-Inhibition oder Repression durch Methionin und Cystein sein (Kumar, D. and Gomes, J., 2005). Die Arbeiten

von Kase und Nakayama aus dem Jahr 1975 an *C. glutamicum* haben zum Ergebnis, dass doppelte oder dreifach resistente Mutanten, die aus einer einfachen Analogon-resistenten Mutante hervorgegangen sind, eine höhere Methionin-Produktion aufweisen als eine Mutante, die nur eine einfache Analogon-Resistenz aufweist. Die Methionin-Produktion scheint sich mit Zunahme von Vielfachresistenzen zu steigern (Kase, H. and Nakayama, K., 1975a). Diese Ergebnisse werden durch die Arbeit von Sharma gestützt (Sharma, S., 2001).

### **3.5 Screening- und Produktionsmedien**

Mikroorganismen verändern die Expression ihrer Stoffwechsel-Enzyme in Abhängigkeit von den sie umgebenden Wachstumsbedingungen. Je nach Umweltlage werden erhaltende und/oder produzierende Enzyme gebildet. Eine wichtige Voraussetzung für das Screening nach Methionin-überproduzierenden Mikroorganismen ist ein gutes Minimalmedium, das die Wachstumsansprüche des Organismus nicht nur gerade so erfüllt sondern eine mögliche Überproduktion einbezieht. Für die schwefelhaltige Aminosäure Methionin bedeutet das einen erhöhten Schwefelanteil im Medium, wobei die Medienkomponenten Ammoniumsulfat für das Wachstum und Ammoniumthiosulfat energetisch günstig für die Methionin-Produktion erscheinen. Ein Minimalmedium scheint geeigneter als ein komplexes in Bezug auf die anschließende Aminosäureanalytik. Bei komplexen Bestandteilen kann es zu verfälschten Analyseergebnissen hinsichtlich der Methionin-Bildungsrate kommen, wenn sich schon ursprünglich Methionin im Medium befand, das nur zu einem bestimmten Anteil während des Wachstums verbraucht wird. Darüber hinaus ist ein komplexer Mediumsbestandteil wie z.B. Hefeextrakt nicht als Stickstoffquelle zu empfehlen, da neben anderen Aminosäuren auch Methionin enthalten ist, welches eine Synthese von Methionin durch den Organismus unnötig macht (Kumar, D. and Gomes, J., 2005). Bei Verwendung eines Minimalmediums werden auxotrophe Mutanten in der Untersuchung außer Acht gelassen. In Tabelle 1 auf S. 17 werden die Schwefel-Bilanzen einiger Screening- und Produktionsmedien gegenübergestellt.



**Tab. 1:** S-Bilanzen einiger Medien in Publikationen zum Thema der mikrobiologischen Methionin-Produktion

Quelle	S-Gehalt [g/l]	Theoretisch max. mögliche Met- Bildung [g/l]	Met-Messung [g/l]	Analytik
Alfoldi <sup>a</sup> 1958	0,02	0,1		
Banik 1974	0,2	0,9	3 <sup>b</sup>	Papierchromatographie
Deutenberg 2003	15,6	> 50	0,5	HPLC
Kumar 2003	0,8	3,7	2,3	Kolorimetrischer Test
Mampel 2005	11,3	> 50	< 0,01	HPLC
Mondal <sup>c</sup> 1990	0,02	0,1	2,4 <sup>b</sup>	Mikrobiologischer Assay
Mondal <sup>c</sup> 1994 A	s.o.	s.o.	25,5 <sup>b</sup>	Mikrobiologischer Assay Kolorimetrischer Test
Mondal <sup>c</sup> 1994 B	s.o.	s.o.	13 <sup>b</sup>	Mikrobiologischer Assay Papierchromatographie
Mondal <sup>c</sup> 1994 C	s.o.	s.o.	5,5 <sup>b</sup>	Mikrobiologischer Assay Papierchromatographie
Nakayama 1971	4,8	> 20	3,4	keine Angabe
Sharma 2001	2,3	> 10	0,5	Natriumprussiat-Test Kolorimetrischer Test (Greenstein, J.P. and Winitz, M., 1961)

<sup>a</sup> Alfoldi-Medium aufgeführt, da es vielerorts (u. a. von Mondal) zitiert wurde

<sup>b</sup> Werte aufgrund der S-Bilanzen der eingesetzten Produktionsmedien nicht möglich

<sup>c</sup> Verwendung des Alfoldi-Mediums

In den Arbeiten von Mondal im Zeitraum 1990 bis 1994 (Mondal, S. et al., 1990; Mondal, S. et al., 1994b; Mondal, S. et al., 1994a; Mondal, S. and Chatterjee, S.P., 1994) wurde von

Methionin-Bildungen zwischen 2,4 und 25,5 g/l im Kulturüberstand berichtet. Allerdings enthielt das Medium, das einer Arbeit von Alfoldi 1958 entnommen ist (Alfoldi, 1958), nur 20 mg/l Schwefel, womit eine Methionin-Ausbeute von höchstens 0,1 g/l rechnerisch möglich ist. Das Thema der Alfoldi-Arbeit ist die Produktion von Megacin (ein Bacteriocin) durch *Bacillus megaterium* in verschiedenen zusammengesetzten synthetischen Medien. Trotzdem wurde das Alfoldi-Minimalmedium von Mondal unverändert als Produktionsmedium für die Aminosäure Methionin eingesetzt. Die Arbeiten von Mondal wurden und werden vielfach zitiert in Bezug auf die Methionin-Analoga-Selektionsstrategie zum Auffinden von Methionin-Überproduzenten. Andererseits erkannte schon Nakayama 1971 in seiner Forschung (Nakayama et al., 1971) wie wichtig eine ausreichende Versorgung des Organismus mit Schwefel für eine Methionin-Produktion ist. Mit 2 % Ammoniumsulfat im Medium ist eine Methionin-Bildung von >20 g/l möglich. Allerdings ist die Messmethode nicht beschrieben und daher potenziell fragwürdig. In der Arbeit von Kumar 2003 (Kumar, D. et al., 2003) ist zwar die Schwefel-Bilanz in einem angemessenen Verhältnis zur gemessenen Methionin-Menge, aber die Messung erfolgte mit einem kolorimetrischen Test ohne Überprüfung mit einer verlässlichen Analytik wie z.B. HPLC oder GC. Weitere Forschungsarbeiten von Banik 1974 und 1975 (Banik, A.K. and Majumdar, S.K., 1975a; Banik, A.K. and Majumdar, S.K., 1975b; Banik, A.K. and Majumdar, S.K., 1975c; Banik, A.K. and Majumdar, S.K., 1974) weisen auf die Existenz mehrerer *C. glutamicum* Mutanten hin, die bis zu 3 g/l Methionin bilden sollten. Auch in diesem Fall ist das Medium mit einem Schwefelgehalt von 0,2 g/l nur zu einer maximalen Methionin-Bildung von rund 1 g/l in der Lage. Die Fehler könnten in einer nicht zuverlässig arbeitenden Aminosäure-Analytik begründet sein. Banik und Mondal arbeiteten mit einem papierchromatographischen Methionin-Nachweis, Mondal zusätzlich mit einem kolorimetrischen Test und einem mikrobiologischen Test. In der Literaturrecherche fällt auf, dass je moderner die wissenschaftlichen Arbeiten sind, um so geringere Methionin-Konzentrationen nachgewiesen wurden, z.B. nur noch 0,5 g/l ((Deutenberg, D., 2003) - HPLC; (Sharma, S., 2001) – Natriumprussiat-Test) oder weniger als 10 mg/l Methionin im Kulturüberstand (Mampel, 2005 – HPLC). In den letzten Jahrzehnten wurde die Aminosäureanalytik immer verlässlicher und quantitativ genauer durch die Methoden HPLC, GC und GC-MS.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Bakterienstämme

#### 4.1.1 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (DSM 20300)

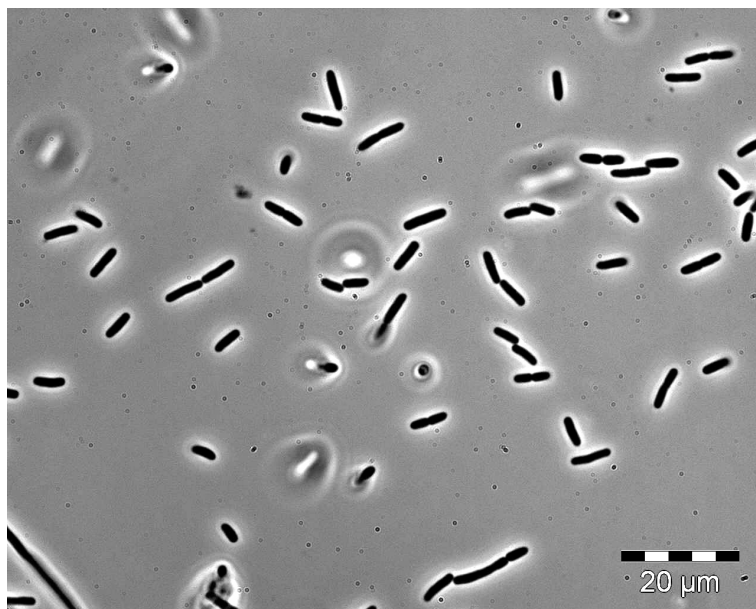
*Corynebacterium glutamicum* DSM20300 (Wildtyp) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig-Stöckheim bezogen.

#### 4.1.2 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21608

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 21608 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen.

#### 4.1.3 *Escherichia coli* B834

Der Stamm *Escherichia coli* B834 (Abb. 7, S. 19) mit dem Genotyp  $F^- \text{ompT hsdS}_B (\text{r}_B^- \text{m}_B^-)$  gal dcm met wurde von Merck Biosciences (Beeston/Nottingham) als Glycerinstock bezogen. Es handelt sich um einen Methionin-auxotrophen Stamm (Wood, W.B., 1966).



**Abb. 7:** Mikroskopische Aufnahme von *E. coli* B834 in Medium 53 in 100er Vergrößerung

## 4.2 Nährmedien

Bei jeder Komponente wird Hersteller und Artikelnummer angegeben. Wenn keine anderen Angaben gemacht sind, bezieht sich jedes Rezept auf die Herstellung von 1 l Medium.

### 4.2.1 Medium 53

Komplexes Stammhaltungsmedium für *C. glutamicum* und *E. coli*.

5,5	g	Glucose, D(+)- x H <sub>2</sub> O	Merck	104074
10	g	Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	Fluka	70172
5	g	Hefeextrakt	Merck	103753
5	g	Natriumchlorid	Merck	106400
15	g	Agar (bei Bedarf)	Merck	101614

pH 7,2-7,4, autoklavieren (20 min 121 °C)

### 4.2.2 Medium Banik 74

Minimales Stammhaltungsmedium für *C. glutamicum* und Grundlage für den Methionin-Analoga Platten-Test der *C. glutamicum*-Mutanten.

55	g	Glucose, D(+)- x H <sub>2</sub> O	Merck	104074
8	g	Harnstoff	Roth	7638.5
1	g	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104877
250	mg	Magnesiumsulfat *7 H <sub>2</sub> O	Fluka	63138
1	mg	Biotin, d-	Sigma	B-4501
15	g	Agar	Merck	101614

Lösung 1:

55 g	Glucose *H <sub>2</sub> O
15 g	Agar (bei Bedarf)
700 ml	dest. H <sub>2</sub> O

#### Lösung 2:

8 g	Harnstoff
1 g	Kaliumdihydrogenphosphat
200 ml	dest. H <sub>2</sub> O

#### Lösung 3:

250 mg	Magnesiumsulfat *7 H <sub>2</sub> O
50 ml	dest. H <sub>2</sub> O

Die Lösungen 1-3 werden getrennt autoklaviert und nach Abkühlung auf Raumtemperatur steril vereint. Nach Zugabe von 10 ml Biotin-Stammlösung (100 mg/l; sterilfiltriert) wird der pH mit 0,5 M Schwefelsäure auf 7,3 eingestellt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Ab dem Abschnitt 4.2.2.a wurden zu dem Grundrezept des B74-Agars (4.2.2) ein oder mehrere Methionin-Analoga in unterschiedlichen Konzentrationen zudosiert.

#### **4.2.2.a DL-Norleucin-B74-Agar**

0,2 – 12,0 g	DL- Norleucin	Fluka	74580
--------------	---------------	-------	-------

#### **4.2.2.b DL-Ethionin-B74-Agar**

2,0 – 8,0 g	DL- Ethionin	Sigma	E-5139
-------------	--------------	-------	--------

#### **4.2.2.c DL-Methionin-sulfoxid-B74-Agar**

2,0 – 12,0 g	DL- Methionin-sulfoxid	Fluka	64430
--------------	------------------------	-------	-------

#### **4.2.2.d L-Ethionin-B74-Agar**

0,9 g	L- Ethionin	Sigma	E-1260
-------	-------------	-------	--------

#### **4.2.2.e L-Norleucin-B74-Agar**

0,9 g	L- Norleucin	Fluka	74560
-------	--------------	-------	-------

#### **4.2.2.f DL-Methionin-methylsulfoniumchlorid-B74-Agar**

5,0 – 15,0 g	DL- Methionin-methylsulfoniumchlorid	Fluka	64382
--------------	--------------------------------------	-------	-------

#### **4.2.2.g 1,2,4-Triazol-B74-Agar**

6,0 – 12,0 g	1,2,4- Triazol	Fluka	90635
--------------	----------------	-------	-------

#### **4.2.2.h N-Acetyl-DL-Methionin-B74-Agar**

5,0 – 10,0 g	N- Acetyl- DL- Methionin	Sigma	A-1876
--------------	--------------------------	-------	--------

#### **4.2.2.i Kombination DL-Ethionin mit DL-Norleucin B74-Agar**

5 g	DL- Ethionin	Sigma	E-5139
5 g	DL- Norleucin	Fluka	74580

#### 4.2.2.j Kombination DL-Ethionin mit DL-Norleucin und 1,2,4-Triazol B74 Agar

5 g	DL- Ethionin	Sigma	E-5139
5 g	DL- Norleucin	Fluka	74580
3 g	1,2,4- Triazol	Fluka	90635
5 g	DL- Ethionin	Sigma	E-5139
5 g	DL- Norleucin	Fluka	74580
6 g	1,2,4- Triazol	Fluka	90635

#### 4.2.3 Minimalmedium 1 (MM1)

Screening- und Produktionsmedium für *C. glutamicum*-Mutanten.

22	g	Glucose, D(+)- x H <sub>2</sub> O	Merck	104074
1	g	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104877
30	mg	Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck	105833
13	mg	Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck	102382
10	g	Ammoniumsulfat	Fluka	9978
10	g	Ammoniumthiosulfat	Aldrich	33672-6
1	mg	D-Biotin	Sigma	B-4501

Lösung 1:

22 g	Glucose* H <sub>2</sub> O
500 ml	dest. H <sub>2</sub> O

Lösung 2

1 g	Kaliumdihydrogenphosphat
100 ml	dest. H <sub>2</sub> O

Lösung 3

30 mg	Magnesiumchlorid* 6H <sub>2</sub> O
13 mg	Calciumchlorid* 2 H <sub>2</sub> O
90 ml	dest. H <sub>2</sub> O

#### Lösung 4

10 g	Ammoniumsulfat
10 g	Ammoniumthiosulfat
300 ml	dest. H <sub>2</sub> O

Lösung 1 wird sterilfiltriert, Lösungen 2-4 werden getrennt autoklaviert, steril vereint, mit 10 ml Biotin-Stammlösung (100 mg/l; sterilfiltriert) versetzt und mit 1 M NaOH auf pH 7,3 eingestellt.

#### 4.2.3.a MM1\_1

Steriles MM1-Medium

##### Lösung 5: 100x Salzstammlösung

1 g	Eisensulfat* 7H <sub>2</sub> O
0,5 g	Mangansulfat* H <sub>2</sub> O
1000 ml	dest. H <sub>2</sub> O; sterilfiltrieren

##### Lösung 6: 100x Vitaminstammlösung

20 mg	Thiamin*HCl
20 mg	Vitamin B12
1000 ml	dest. H <sub>2</sub> O; sterilfiltrieren

1 l steriles MM1-Medium wird mit 10 ml Lösung 5 und 10 ml Lösung 6 zu MM1\_1-Medium vereint.

#### 4.2.3.b MM1\_2

1 l steriles MM1\_1-Medium wird mit 5 ml einer 3 g/l 3,4-Dihydroxy-Benzoesäure-Stammlösung versetzt.



#### 4.2.4 Minimalmedium 2 (MM2)

Screening- und Produktionsmedium für *C. glutamicum*-Mutanten.

22 g	Glucose, D(+)- x H <sub>2</sub> O	Merck	104074
3 g	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104877
6 g	Di-Natriumhydrogenphosphat	Fluka	30427
0,5 g	Natriumchlorid	Merck	106400
30 mg	Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck	105833
13 mg	Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck	102382
10 g	Ammoniumsulfat	Fluka	9978
10 g	Ammoniumthiosulfat	Aldrich	33672-6
5 g	Harnstoff	Roth	7638.5
20 mg	Eisen(II)-sulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Merck	103965
5 mg	Mangan(II)-Sulfat x H <sub>2</sub> O	Fluka	63554
250 mg	Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Fluka	63138
1 mg	D-Biotin	Sigma	B-4501
200 µg	Thiaminhydrochlorid	Sigma	T-4625
200 µg	Cyanocobalamin / Vitamin B 12	Merck	24592
15 mg	3,4-Dihydroxybenzoesäure	Fluka	37580
13 µg	Mangan(II)-Sulfat x H <sub>2</sub> O	Fluka	63554
22 µg	Nickel(II)-sulfat x 6 H <sub>2</sub> O	Merck	106727
145 µg	Natriummolybdat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck	106521
200 µg	Di-Natriumtetraborat x 10 H <sub>2</sub> O	Merck	106308
540 µg	Kupfer(II)-sulfat x 5 H <sub>2</sub> O	Merck	102790
1,6 mg	Zink(II)-Sulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Merck	108883
1,74 mg	Eisen(III)-chlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck	103943

Lösung 1:

22 g	Glucose* H <sub>2</sub> O
200 ml	dest. H <sub>2</sub> O; sterilfiltrieren

Lösung 2: 10x Phosphatpuffer

30 g	Kaliumdihydrogenphosphat
60 g	Di-Natriumhydrogenphosphat
5 g	Natriumchlorid
1000 ml	dest. H <sub>2</sub> O; pH auf 7,3 einstellen; autoklavieren

Lösung 3: 200x Magnesium-/Calcium-Stammlösung

6,0 g	Magnesiumchlorid* 6 H <sub>2</sub> O
2,6 g	Calciumchlorid* 2 H <sub>2</sub> O
1000 ml	dest. H <sub>2</sub> O; autoklavieren

Lösung 4:

10 g	Ammoniumsulfat
10 g	Ammoniumthiosulfat
300 ml	dest. H <sub>2</sub> O; autoklavieren

Lösung 5: 200x Salzstammlösung

4 g	Eisen(II)-sulfat* 7 H <sub>2</sub> O
50 g	Magnesiumsulfat* 7 H <sub>2</sub> O
1 g	Mangan(II)-sulfat* H <sub>2</sub> O
5 g	Natriumchlorid
1000 ml	0,1 M HCL; sterilfiltrieren

Lösung 6: 500x Spurenelementelösung

100 mg	Di-Natriumtetraborat * 10 H <sub>2</sub> O
72,5 mg	Natriummolybdat* 2 H <sub>2</sub> O
1,6 mg	Zink(II)-sulfat*7 H <sub>2</sub> O
270 mg	Kupfer(II)-sulfat* 5 H <sub>2</sub> O
6,5 mg	Mangan(II)-sulfat* H <sub>2</sub> O
1,74 mg	Eisen(III)-chlorid* 6 H <sub>2</sub> O
11 mg	Nickel(II)-sulfat* 6 H <sub>2</sub> O
1000 ml	0,05 M HCL; sterilfiltrieren

Lösung 7:

5 g	Harnstoff
350 ml	dest. H <sub>2</sub> O; autoklavieren

Lösung 8: 200x 3,4-Dihydroxy-Benzoesäure

3 g	3,4-Dihydroxy-Benzoesäure
1000 ml	dest. H <sub>2</sub> O; sterilfiltrieren

200 ml Lösung 1 werden mit 100 ml Lösung 2, 5 ml Lösung 3, 300 ml Lösung 4, 10 ml Biotin-Stammlösung (100 mg/l), 5 ml Lösung 5, 10 ml 100x Vitaminstammlösung (siehe MM1\_1), 2 ml Lösung 6, 350 ml Lösung 7 und 5 ml Lösung 8 vereint. Die einzelnen Lösungen mit z. T. wiederkehrenden Komponenten erklären sich durch die größere Flexibilität bei der Medienoptimierung. Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt und das Volumen mit sterilem dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt.

#### **4.2.5 MM2\_2**

Wie MM2, aber Lösung 4 wird ohne Ammoniumthiosulfat und mit nur 5 g/l Ammoniumsulfat hergestellt.

#### **4.2.6 MM2\_3**

Wie MM2\_2 aber mit zusätzlich 5 g/l tryptisch verdaulichem Casein (Sigma, C-0626).

### **4.3 Puffer und Lösungen**

#### **4.3.1 Lysispuffer**

1,58 g	TRIS/HCl	Fluka	93347
23,4 g	Natriumchlorid	Merck	106400
775 mg	Na-EDTA	Serva	11280

#### 4.3.2 MOPS-Stammlösung

400 g	MOPSO	Sigma	M-1254
	+		
	NH <sub>4</sub> OH (25%) auf pH 7,0		

#### 4.3.3 0,1 M Magnesiumsulfatlösung

24,6 g	Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Fluka	63138
--------	--------------------------------------	-------	-------

#### 4.3.4 Methionin-Standards in Wasser und Medium

L- Methionin	Fluka	64319
--------------	-------	-------

Die Stammlösung enthält 2 g/l L-Methionin im gewünschten Lösungsmittel. Aus dieser Stammlösung werden alle Verdünnungen bis hin zu 100 mg/l Methionin hergestellt. Bei Standards mit einer Endkonzentration < 100 mg/l wird die 100 mg/l Stammlösung als Basis für weitere Verdünnungsschritte eingesetzt.

#### 4.3.5 Rinder-Serum-Albumin- (BSA-) Standards und Bradford-Reagenz

Rinder-Serum-Albumin (als Standard)	Sigma	A-7638
Bradford Reagenz	Sigma	B-6916

Die BSA-Stammlösung enthält 2 g/l BSA in Wasser und wurde sterilfiltriert. Aus dieser Stammlösung werden folgende Verdünnungen hergestellt: 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,3 und 0,2 g/l. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. Die Bradford-Reagenz wird bei 4 °C aufbewahrt.

#### **4.3.6 Lysozym-Stammlösung**

Lysozym

Boeringer

83451423-02

Die Lysozym-Stammlösung enthält 50 g/l; sie wird sterilfiltriert und als Grundlage für weitere Verdünnungen eingesetzt. Die im Zellaufschluss eingesetzte Endkonzentration beträgt 1-1,2 g/l Lysozym.

#### **4.3.7 Holzextrakt**

Birken-Holz-Zahnstocher

Papstar

20 zerkleinerte Holz-Zahnstocher wurden in 100 ml dest. H<sub>2</sub>O autoklaviert; der Extrakt wurde sterilfiltriert bei 4 °C aufbewahrt.

## 4.4 Geräte und sonstige Materialien

### 4.4.1 Materialien

Materialien	Hersteller
Halb-Mikro-Küvetten PS, 10x4x45 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Rotilabo Spritzenfilter steril, 0,22 µm, Zellulosemischester	Roth, Karlsruhe
Pasteur Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Mikroeinsätze für GC-Vials	CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe
GC-Vials (Flasche G1 klar) mit Schraubkappe	CS-Chromatographie Service GmbH
G8-L und Dichtscheibe G8-Sil (Art. Nr. 300352)	Langerwehe
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Filter für mechanische 8-Kanal-Pipette 5-100 µl Biohit	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Filter für mechanische 8-Kanal-Pipette 0,5-10 µl Biohit	Biohit
Filter für elektronische 8-Kanal-Pipette 50-1200 µl Biohit	Biohit
Spitzen für mechanische 8-Kanal-Pipette 5-100 µl Biohit	Biohit
Spitzen für mechanische 8-Kanal-Pipette 0,5-10 µl Biohit	Biohit
Spitzen für elektronische 8-Kanal-Pipette 50-1200 µl Biohit	Biohit
Gewebekultur-96 well Platten mit Deckel steril, flacher Boden, 0,38 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotest-96 well Platten aus PS ohne Deckel unsteril, flacher Boden; 0,38 ml	Sarstedt
Acetat-Folien für 96 well Platten (Standard Applikation), transparent	Sarstedt
Pipettierreservoir für Mehrkanalpipetten aus Polypropylen, 120 ml, autoklavierbar	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
Glaswaren	Schott, Mainz
Parafilm	Brand, Wertheim
Einmalspritzen, 2-teilig, steril	Braun, Melsungen
Einmal-Injektions-Kanülen steril	Braun
Falcon-Tube 15 ml, 120x17 mm, PS, unsteril	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Tube 50 ml, 114x28 mm, PP, unsteril	Sarstedt
Falcon-Tube 50 ml, steril	Deltalab; VWR International
Semper guard Einmal-Handschuhe Latex puderfrei unsteril	Schmidt Laborbedarf, Braunschweig
Serologische Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, einzeln steril verpackt	Sarstedt, Nümbrecht
Zellaufschluss-Röhre 13 ml, 100x16 mm, PP mit farblosem Stopfen	Sarstedt
Kryo-Vials 1,8 ml	Nalgene/Thermo Fisher Scientific Langenselbold
Zahnstocher aus Holz	Pap Star, Kall
Petrischalen 92x16 mm mit Nocken, steril	Sarstedt, Nümbrecht
55x16 mm ohne Nocken, unsteril	

#### 4.4.2 Kits

EZ:faast GC-FID Physiological Amino Acid Analysis Kit, KG0-7165 von der Firma Phenomenex (Aschaffenburg) zur Bestimmung freier Aminosäuren.

#### 4.4.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Labofuge GL, Ausschwingrotor 2150 max. 5000 rpm; Baujahr 1987	Heraeus sepatec GmbH (Kendro), Osterode
Infors-Schüttler HT, Minitron, Auslenkung 25 mm Rundschüttelbewegung	Infors, Einsbach
PST-60 HL plus Thermo Shaker (für 2x 96 well Platten)	Kisker, Steinfurt
PST-60 HL-4 Thermo Shaker (für 4x 96 well Platten)	Kisker, Steinfurt
IKA-Minishaker MS2	IKA, Staufen
Beheizbarer RCT basic Magnetrührer 0-1100 rpm	
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Biofuge stratos	(Heraeus instruments) Kendro Laboratory Products, Hanau
Infors-Brutschrank, 25 mm Rundschüttelbewegung	Infors HT, Einsbach
Klimaschrank 0-70 °C, Serie 6000	tritec Hannover
Feinwaage sartorius analytic	sartorius, CTI 5108, Göttingen
Laborwaage sartorius universal, U 4600 P+	sartorius
Hettich Zentrifuge, Rotanta 46 RC, Rotor 6200 rpm max., 2x 300 g, 4620 für 8x 96 well Platten	Hettich, Tuttlingen
Digital pH Meter, pH 525	WTW, Weilheim
pipetboy	TEC NOMARA, Zürich, Schweiz
Spektralphotometer PM 2 A	Zeiss Microimaging, Göttingen
R 100 A Rekorder	Perkin-Elmer
Easy Reader EAR 400 AT, 550 nm Filter, für 96 well Platten	SLT-Labinstruments/Tecan, Crailsheim
Mobiler UV-Strahler, 2 Röhren 254 nm	(Heraeus instruments) Kendro Laboratory Products, Hanau
Heizwasserbad mit Thermostat	GFL, Burgwedel
eppendorf Zentrifuge 5417	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Zeiss Axioplan, Göttingen
Stereomikroskop STEMI SV8	Zeiss
mLine Mehrkanalpipette, 8-Kanal, 5-100 µl, mLine 100	Biohit, Rosbach v. d. Höhe
mLine Mehrkanalpipette, 8-Kanal, 0,5-10 µl, mLine 10	Biohit
eLine elektronische Mehrkanalpipette, 8-Kanal, 50-1200 µl	Biohit
Mehrkanal-Pipetten-Höhenfixierungsschiene	Eigenbau, Institut für Technologie (FAL)
Finnpipette 1-Kanal 0,5-10 µ	Thermo Labsystems, Langenselbold
Finnpipette 1-Kanal 20-200 µl	Thermo Labsystems

Geräte	Hersteller
Finnpipette 1-Kanal 200-1000 µl	Thermo Labsystems
Rotamax 120	Heidolph instruments, Schwabach
Gaschromatograph GC-17A	Shimadzu, Duisburg
Focus-Liner	SGE, Darmstadt
Septen AG0-7517	Phenomenex, Aschaffenburg
Datenwandler CBM-10A lite	Shimadzu, Duisburg
Probenaufgabe AOC-17	Shimadzu
Probenaufgabe AOC-1400	Shimadzu
Software ClassGC-10A, V.1.62	Shimadzu

## 4.5 Methoden

### 4.5.1 Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von allen *C. glutamicum*- und *E. coli*-Stämmen erfolgte standardmäßig auf Medium 53 (DSMZ)-Agarplatten mit anschließender Inkubation im Brutschrank (3-Ösen-Ausstrich). *C. glutamicum* wird 24 h bei 30 °C und *E. coli* 18-20 h bei 30 °C angezogen.

### 4.5.2 Flüssigkultur

Kultivierungen von *C. glutamicum* im Schüttelkolben wurden immer in 100 ml Schikanekolben (2 Schikanen) bei 30-32 °C, 150-180 rpm und einer Auslenkung von 25 mm im Infors-Schüttler HT Minitron (Infors, Einsbach) durchgeführt. Um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden, wurden die Kolben mit nicht mehr als 10-20 Vol. % Medium befüllt. Die Kultivierung von Mutanten des Stammes DSM 20300 in Reagenzgläsern mit Magnetrührkernen erfolgte im Klimaschrank Serie 6000 (tritec, Hannover) bei 30 °C für 24-28 h und 700 rpm mit Hilfe eines RCT basic Magnetrührers (IKA, Staufen). *E. coli* wurde in 100 ml Schüttelkolben ohne Schikanen bei 30-37 °C, 150 -180 rpm und einer Auslenkung von 25 mm in einem Infors-Brutschrank (Infors, Einsbach) inkubiert. Für beide Fälle gelten die Möglichkeiten, die Geschwindigkeit des Wachstums durch eine Erniedrigung der Temperatur, eine Verkürzung der Inkubationsdauer, eine Vergrößerung des Füllvolumens bzw. eine Reduktion der Schüttelfrequenz zu drosseln.

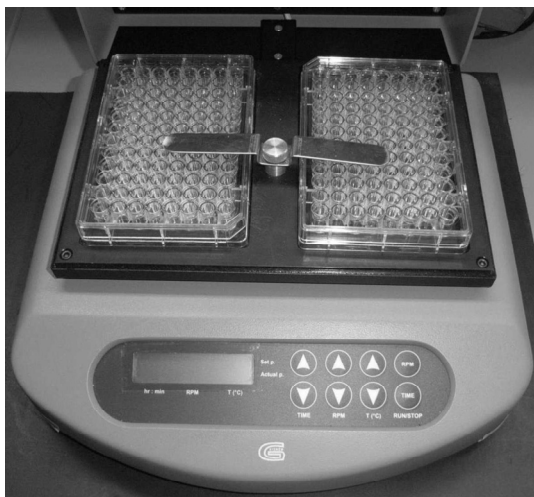


#### 4.5.2.a Kultivierung von DSM 20300-Mutanten im 96 well Maßstab (Hochdurchsatz)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Abb. 8:** Beispielhafte Darstellung einer 96 well Platte

Jede 96 well Platte ist in 8 Reihen (A-H) und 12 Spalten (1-12) mit insgesamt 96 Reaktionsräumen (wells) unterteilt, die ein maximales Fassungsvermögen von je 0,38 ml besitzen (Abb. 8, S. 33). Die 96 well Platten werden in einem temperierbaren 2-Platten- oder 4-Platten-Schüttelinkubator für Mikrotiterplatten PST-60 HL Thermo Shaker (Kisker; Abb. 9, S. 33) inkubiert. Für eine Kultivierung im Hochdurchsatz wird die Methode anhand von 4 96 well Platten im 4-Platten-Schüttelinkubator beschrieben.



**Abb. 9:** 2-Platten- bzw. 4-Platten-Thermo Shaker (Kisker, Steinfurt)

## Arbeitsschritte der Kultivierung von DSM 20300-Mutanten im Hochdurchsatz:

- Herstellung der Vorkultur: 4 Mikrotest 96 well Platten werden mit Hilfe einer elektronischen 8-Kanal-Pipette mit 200 µl MM2\_2-Medium pro well befüllt; Reihe D bleibt unbeimpft; mit Hilfe von Holzzahnstochern werden pro well 1-2 Einzelkolonien DSM 20300 von einer Medium 53-Agarplatte eingerieben; Inkubation 15 h, 25 °C, 1100 rpm im Thermoshaker (Abb. 9, S. 33)
- Extinktionsmessung der Vorkultur: eine 1:20 Verdünnung wird mittels automatischem 96 well Spektralphotometers (Easy Reader EAR 400 AT; SLT-Labinstruments/Tecan) bei 550 nm vermessen; dazu werden 4 Platten mit 190 µl MM2\_2 + 10 µl Zellsuspension vorbereitet, 10 min bei Raumtemperatur und 1100 rpm geschüttelt und vermessen; die Vorkultur sollte sich in der exponentiellen Phase befinden
- Herstellung der Hauptkultur: 4 Mikrotest 96 well Platten werden mit 200 µl MM2\_2-Medium + 2 µl Vorkultur pro well (1 Vol. %) befüllt; Inkubation 7 h, 32 °C, 1100 rpm
- Extinktionsmessung der Hauptkultur: eine 1:20 Verdünnung wird im Easy Reader vermessen; die Hauptkultur sollte sich in der exponentiellen Phase befinden
- Lagerung der Hauptkultur: Eine Lagerung von mind. 12 h bei 4 °C ist erforderlich, um störende Enzymtätigkeiten im anschließenden *E. coli* Test zu vermeiden

### 4.5.3 Stammkonservierung mittelfristig

Alle 4-6 Wochen wurden aus einer unangetasteten Stammhaltungsplatte neue Arbeits- und Stammhaltungsplatten (Medium 53 Agar) von *C. glutamicum* und *E. coli* hergestellt, die mit Parafilm umwickelt dunkel bei 4 °C gelagert wurden.

### 4.5.4 Stammkonservierung langfristig

Der zu konservierende Stamm wurde in Medium 53 bis zur exponentiellen Phase inkubiert, bei Bedarf wurde die Zellsuspension aufkonzentriert. Die Suspension wurde 5 min bei 5000 g zentrifugiert und ein Teil des Überstandes verworfen; das Pellet wurde im restlichen Medium resuspendiert und zusammen mit 99,5 % igem sterilem Glycerin im Verhältnis 1:1 in Kryovials von Nalgene (Fassungsvermögen 1,8 ml) vereint. 600 µl Suspension und 600 µl Glycerin wurden gut durchmischt, in flüssigem Stickstoff bei -196 °C für ca. 2 min schockgefroren und bei -80 °C eingelagert (mehrere Jahre).

#### 4.5.5 Bestimmung des Bakterientiters

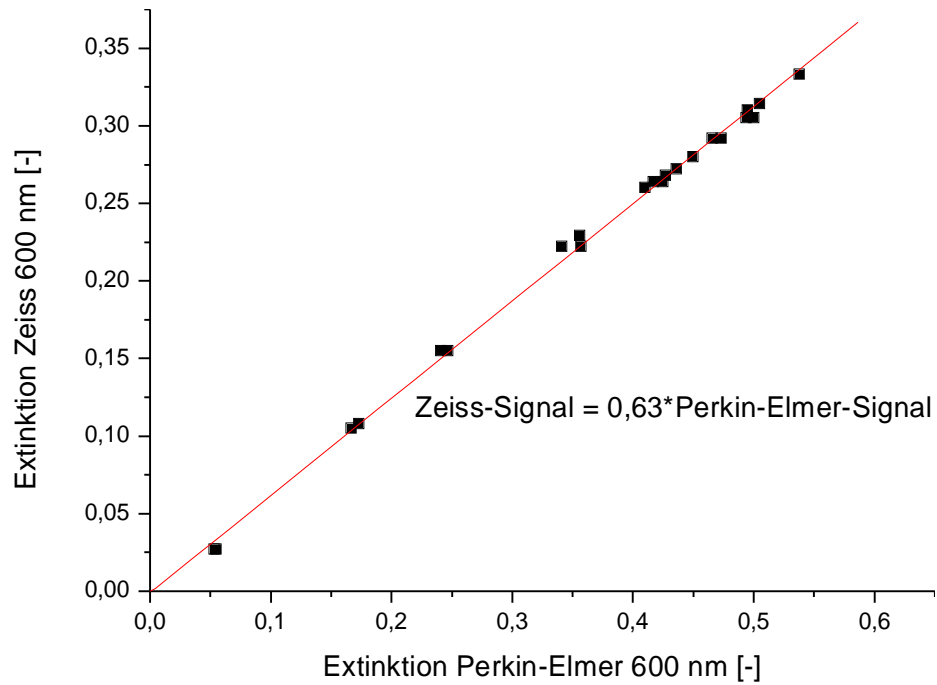
Das Wachstum der Bakterien wurde über die Messung der Extinktion (Optische Dichte, OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit dem Spektralphotometer PM 2A von Zeiss verfolgt. Als Leerwert diente jeweils das unbeimpfte Kultivierungsmedium. Die Zellzählung erfolgte mittels Thoma-Kammer. Bei *C. glutamicum* entspricht eine Extinktion<sub>600</sub> von 1,0 ca.  $10^8$  Zellen pro ml (BTM-OD-Korrelation siehe Abschnitt 5.1.3.b).

#### 4.5.6 Messung der optischen Dichte zur indirekten Biomasse-Bestimmung

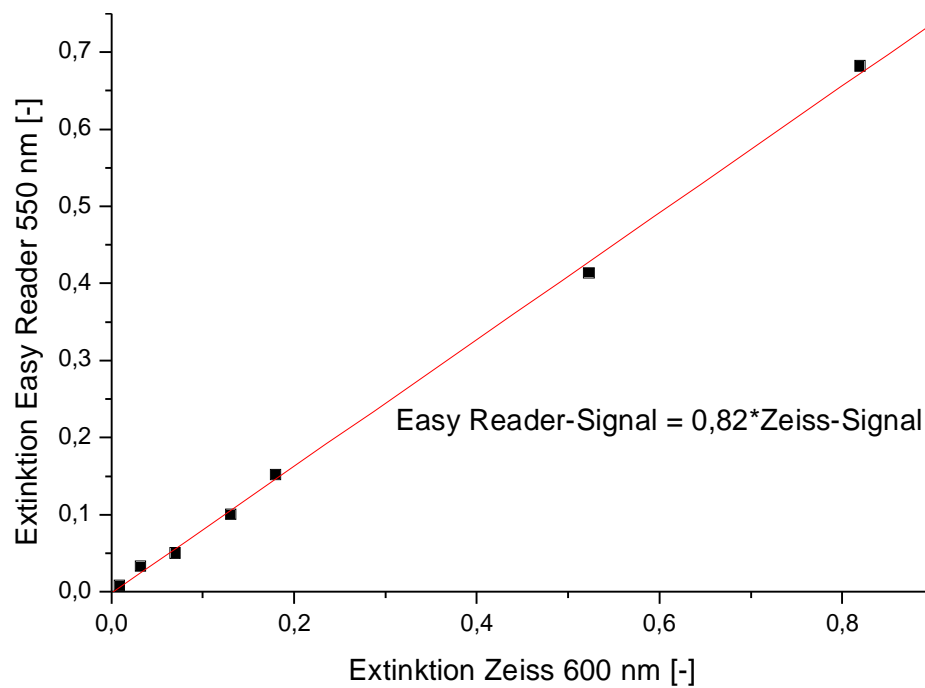
Eine Suspension von Mikroorganismen erscheint ab einer bestimmten Zelldichte trüb, weil die Zellen das einfallende Licht streuen. Die Abnahme des Strahlungsflusses ist unter bestimmten Voraussetzungen der Zelldichte proportional und kann zur Bestimmung der Zellmasse herangezogen werden. Mit einem Photometer kann die Trübung einer Suspension in Form der optischen Dichte leicht ermittelt werden. Die Proportionalität zwischen optischer Dichte einer Bakteriensuspension und ihrer Biotrockenmassekonzentration gilt nur unter bestimmten Voraussetzungen:

- keine zeitveränderliche Eigenabsorption des Mediums oder der Zellen
- homogene Zellverteilung ohne Aggregate, Flocken, etc.
- die Zellmorphologie (Größe und Form) muss konstant sein
- keine Schwebstoffe im Medium

Die Kalibrierung kann durch gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmasse, aber auch durch mikroskopisches Auszählen der Zellen oder eine Protein-Bestimmung erfolgen. Photometrische Messungen wurden bei Kolben- und Reagenzglasversuchen im Spektralphotometer von Zeiss bei 600 nm durchgeführt, bei Versuchen in Mikrotiter 96 well Platten wurde der Easy Reader EAR 400 AT (Tecan) eingesetzt. Die Bradford-Proteinbestimmung wurde sowohl im Zeiss-Photometer als auch im Perkin-Elmer-Photometer gemessen. Um Ergebnisse dieser Photometer direkt miteinander vergleichen zu können, wurden Korrelationen aufgestellt (Abb. 10 und 11, S. 36).



**Abb. 10:** Korrelation zwischen dem Spektralphotometer PM 2 A von Zeiss und dem R 100 A Rekorder von Perkin-Elmer



**Abb. 11:** Korrelation zwischen dem Spektralphotometer PM 2 A von Zeiss und dem Easy Reader (Tecan)

#### 4.5.6.a Messgenauigkeit des Easy Readers

Drei 96 well Platten wurden pro well mit 200 µl B74-Medium befüllt; jede Platte wurde 10x mit dem Easy Reader<sub>550</sub> (Tecan, Crailsheim) vermessen. Die Abweichungen betrugen maximal +/- 0,001. Bei Vermessung einer leeren 96 well Platte liegt eine geringe nicht vorhersagbare Streuung der Messwerte in den verschiedenen wells vor; diese well zu well Unterschiede innerhalb jeder einzelnen Platte sind durch die Herstellung bedingt. Nach rechts hin wird der Mittelwert der Spalten größer; er beginnt mit 0,038 (Spalte 1-7), über 0,039 (Spalte 8-11) bis zu 0,04 (in Spalte 12). Der kleinste Einzelwert im well beträgt 0,037, der höchste 0,041. Der Mittelwert aller 96 wells einer leeren Platte ist 0,0385 +/- 0,002 = +/- 5 %. Dieser 5 %ige Fehler muss bei der Beurteilung der Messergebnisse, vor allem im *E. coli* B834-Test, berücksichtigt werden.

*Berechnung des arithmetischen Mittels  $\bar{x}$  (Mittelwert)*

$$\bar{x}_{arithm} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

#### 4.5.7 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Die Korrelation von optischer Dichte und BTM wurde mittels Geradenregression bestimmt. Hierfür wurden OD- und BTM-Werte im Verlauf der Wachstumskurve simultan aufgenommen. Die OD wurde in Doppelbestimmung, die BTM in Dreifachbestimmung gemessen und das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  gebildet. Hierzu wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße für 24 h bei 105 °C vorgetrocknet, 30 min im Exsikkator abgekühlt und die Leergewichte auf der Analysenwaage bestimmt. Im Verlauf der Kultivierung des Mikroorganismus wurden pro Messpunkt 3x 3 ml für die BTM-Bestimmung und 2x 1 ml für die OD-Messung entnommen. Die OD-Messung erfolgte in geeigneter Verdünnung mit dem im Versuch eingesetzten Medium bei 600 nm im Zeiss-Photometer. Für die BTM-Bestimmung wurden die 3fach Ansätze in 2 Zentrifugierschritten mit jeweils 1,5 ml Zellsuspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pellettiert, anschließend 2x mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und vom Überstand befreit. Die Reaktionsgefäße wurden dann 24 h bei 105 °C

getrocknet und erneut gewogen. Die Gewichts Differenz zwischen Vollgewicht und Leergewicht entspricht der BTM im Reaktionsgefäß. Daraus lässt sich die BTM in g/l errechnen.

#### **4.5.8 Bradford-Proteinbestimmung**

Die Bradford-Proteinbestimmung ist eine schnelle und sensitive Methode zur Quantifizierung von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie Blau existiert in zwei verschiedenen Farbzuständen, rot und blau. Die rote Form wird durch Bindung an Protein in die blaue Form überführt (Bradford, M.M., 1976) und zeigt für 60 min Farbstabilität. Coomassie Blau reagiert dabei mit basischen Aminosäuren im Protein. Das Absorptionsmaximum verschiebt sich dadurch von 465 nm hin zu 595 nm. Die Konzentration einer unbekannten Proteinlösung kann bei 595 nm bestimmt werden, vorausgesetzt das für die Kalibrierung eingesetzte und das unbekannte Protein haben ungefähr den gleichen Gehalt an basischen Aminosäuren. Rinder-Serum-Albumin (BSA) hat sich als international anerkannter Standard für die Bradford-Proteinbestimmung durchgesetzt. Die unbekannte Proteinlösung sollte so verdünnt werden, dass die Messwerte im linearen Bereich der Kalibrierkurve liegen.

- eine Zellsuspension im Bereich der ersten Hälfte der exponentiellen Phase wird in Lysispuffer aufgeschlossen (siehe S. 40 ff.) und anschließend auf ihren Proteingehalt vermessen
- Zentrifugation für 5 min bei 4500 g in der Labofuge GL (Kendro, Osterode)
- Einsatz des Bradford-Reagenzes bei Raumtemperatur
- 1 Teil Protein-Probe (40 µl Probe, pur oder verdünnt, Standard oder Blindprobe) wird mit 30 Teilen Bradford-Reagenz (1200 µl) gemischt; die Blindprobe besteht aus Lysispuffer ohne jegliches Protein, der Proteinstandard aus bekannten Konzentrationen des Proteins BSA
- Alle Proben werden vorsichtig durchmischt und die Inkubationszeit von 10 min gestartet; nach 10 min werden alle Proben direkt in die vorbereiteten Küvetten gefüllt
- Start der OD-Messung: wenige Proben werden einzeln im Zeiss-Photometer bei 595 nm und viele Proben im Perkin-Elmer-Photometer bei 595 nm gemessen (ab jetzt exakt maximal 10 min für alle Probenmessungen inklusive Standards); Empfehlung: zuerst Kalibrierkurve und Probe 1x messen, dann Kalibrierkurve (Doppel) und Proben

(Doppel) messen; die letzte Probe muss noch innerhalb von maximal 10 min von der 1. Probenmessung durchgemessen worden sein

- Wenn die Proben sehr zahlreich sind, dann in 2 oder mehr Gruppen aufteilen, z.B.

a) 1. Kalibrierkurve und 1. Gruppe messen

b) 2. Kalibrierkurve und 2. Gruppe messen

Die maximale Inkubationszeit der Bradford-Reagenz von 60 min darf nicht überschritten werden!

#### 4.5.8.a BSA-Kalibrierkurve in Lysispuffer im Bereich 0-2 g/l

- Die Kalibrierkurve besteht z.B. aus 8 Punkten: 0/ 0,2/ 0,3/ 0,4/ 0,6/ 0,8/ 1,0/ 2,0 [g/l]
- Aus einer 2 g/l BSA-Stammlösung wurden in Lysispuffer alle weiteren Verdünnungsstufen hergestellt, wobei der Leerwert reiner Lysispuffer ist
- aus den Punkten wurde eine Funktionsgleichung aufgestellt nach dem Schema  $y = m \cdot x$ , wobei x die Proteinkonzentration und y die Extinktion ist. Die bei der unbekannten Protein-Lösung gemessenen Extinktionen lassen sich mit Hilfe der Eichkurve leicht den entsprechenden Proteinkonzentrationen zuordnen.
- Eine beispielhafte BSA-Kalibrierkurve im Bereich 0–2 g/l ist in Abb. 12 (S. 39) dargestellt

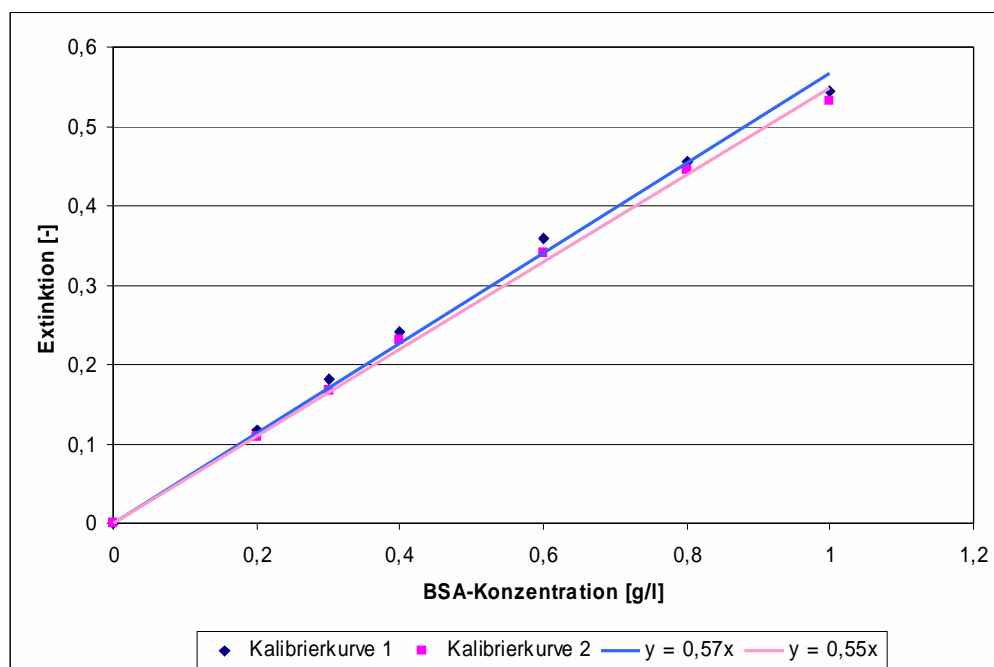


Abb. 12: Beispielhafte Kalibrierkurve 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung

#### **4.5.9 Zellaufschluss von *C. glutamicum***

Beim Zellaufschluss werden Zellen zerstört, um deren Inhalt (Proteine, DNA, mRNA) untersuchen zu können. Es gibt biologische (Enzyme, Phagen, Autolyse), chemische (Säuren/Basen, Lösungsmittel, Detergenzien, Chelatbildner, Antibiotika, chaotrope Reagenzien (= brechen Wasserstoff-Brücken auf und stören hydrophobe Interaktionen)) und physikalische Methoden für den Zellaufschluss, wobei die physikalischen noch in nicht-mechanische (osmotischer Schock, Gefrieren/Auftauen, Trocknen, Dekompression) und mechanische (Hochdruckhomogenisator, Ultraschallhomogenisator, Rührwerkskugelmühle) Methoden unterteilt werden können. Mechanische Aufschlussverfahren, wie z.B. der Ultraschall-Zellaufschluss, führen meist zu einem Temperaturanstieg, so dass das Aufschlussgut im Eisbad gekühlt oder der Aufschluss mit Unterbrechungen durchgeführt werden muss. Beim Ultraschall-Zellaufschluss wird die vom Generator erzeugte hochfrequente Spannung (elektrische Impulse) in mechanische Schwingungen umgewandelt, die von der Sonotrode aufs Medium übertragen werden. Grampositive Bakterien haben eine gegenüber mechanischer Belastung sehr widerstandsfähige Zellwand; sie werden daher leichter durch die Behandlung mit Lysozym (Muramidase, N-Acetylmuramoyl-Hydrolase) aufgeschlossen; dabei kommt es zu einer Zerstörung des Peptidoglykans. Lysozym ist ein Enzym, das aus Hühnereiweiß gewonnen wird.

##### **4.5.9.a Ultraschall-Zellaufschluss**

- Eine Vorkultur mit einer OD zwischen 0,6 – 1,0 wird hergestellt und zum Beimpfen der Hauptkultur eingesetzt. Die Hauptkultur sollte eine OD zwischen 1,0-3,0 für gute Aufschlussresultate haben (exponentielle Phase). Inkubationsbedingungen: 20-30 ml im 100 ml Schüttelkolben, 16-24 h bei 30 °C und 150-180 rpm (Infors)
- Für einen Doppelansatz werden je 5 ml Suspension in Zellaufschluss-Röhren gefüllt
- Das Medium wird durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 g in der Sepatech Labofuge GL (Kendro; siehe Abschnitt 4.4.3, S. 31) abgetrennt
- Der Überstand wird in neue Zellaufschluss-Röhren für eine spätere GC-Messung der Aminosäuren überführt
- Pro Pellet werden 5 ml 4 °C kalter Lysispuffer zugegeben und resuspendiert; wegen Hitzeentwicklung beim Zellaufschluss mit Ultraschall werden die Proben 10 min im Eisbad gekühlt; Proben werden erneut gut durchmischt



- Der Zellaufschluss erfolgt mit 5x 30 sek Ultraschall (KE 76, cont 50 %, Bandelin, Sonoplus HD200), zwischen den einzelnen Aufschlussphasen und nach dem letzten Aufschluss werden die Proben jeweils 10 min im Eisbad gekühlt
- Eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5000 g GL trennt die Zelltrümmer ab ; die Probe wird für weitere 10 min im Eisbad gekühlt
- Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt und bis zur Verwendung eingefroren; im Überstand befinden sich jetzt die freien vorher intrazellulären Aminosäuren

#### **4.5.9.b Lysozym-Zellaufschluss**

- Eine Vorkultur mit einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,6 – 1,0 wird hergestellt und zum Beimpfen der Hauptkultur eingesetzt. Die Hauptkultur sollte eine OD<sub>600</sub> zwischen 1,0-3,0 für gute Aufschlussresultate haben (exponentielle Phase). Inkubationsbedingungen: 20-30 ml im 100 ml Schüttelkolben, 16-24 h bei 30 °C und 150-180 rpm
- Die Suspension wird pellettiert und in Lysispuffer resuspendiert; die Endkonzentration an Lysozym in der aufzuschließenden Suspension sollte immer konstant 1 g/l betragen; das Verhältnis ist immer 490 µl Zellsuspension (verdünnt, unverdünnt oder aufkonzentriert) + 10 µl Lysozym-Stammlösung 50 g/l
- Die Reaktionsgefäße werden für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 min bei 20000 g zentrifugiert; der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung eingefroren; im Überstand befinden sich jetzt die intrazellulären Aminosäuren

### **4.5.10 Gas-Chromatographie (GC)**

#### **4.5.10.a Prinzip**

Mit der Trenntechnik der GC lassen sich Verteilungen zwischen einer gasförmigen mobilen und einer festen oder flüssigen stationären Phase durchführen. Der Stofftransport erfolgt weitgehend in der Gasphase. Trägergase müssen inert sein (z.B. Stickstoff, Wasserstoff, Helium, u. a.), d.h. die mobile Phase darf weder mit den zu trennenden Substanzen noch mit dem Trägermaterial reagieren. Im vorliegenden Fall wurde Wasserstoff als Trägergas eingesetzt. Die Betriebsbedingungen des GC sind in Tab. 2 (S. 42) aufgelistet. Nach der

Einspritzung der Probe kommt es zur Verdampfung und Trennung in der Säule mit anschließender Detektion der getrennten Komponenten (hier: Flammenionisationsdetektor = FID). Durch vorherige Kalibrierung mit Substanzen bekannter Konzentrationen kann die Peakfläche und Retentionszeit im Chromatogramm mit einer bestimmten Substanz und der Konzentration dieser Substanz in der aufgegebenen Probe korreliert werden. Die GC eignet sich zur qualitativen und quantitativen Analyse verdampfbarer Verbindungen in Stoffgemischen. Nicht flüchtige Stoffe müssen durch eine Derivatisierung in flüchtige, stabile Derivate umgewandelt werden. Vorteil gegenüber der Flüssigkeitschromatographie ist das Trägergas mit seiner niedrigen Viskosität, das für eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit der Substanzen im gasförmigen Zustand sorgt. Es kann mit relativ hohen Strömungsgeschwindigkeiten und wegen des geringen Strömungswiderstandes für Gase mit langen und englumigen Trennsäulen gearbeitet werden, wodurch neben hohen Analysegeschwindigkeiten sehr hohe Trennleistungen erreicht werden.

**Tab. 2:** Betriebsbedingungen des Gas-Chromatographen GC-17A (Shimadzu, Duisburg)

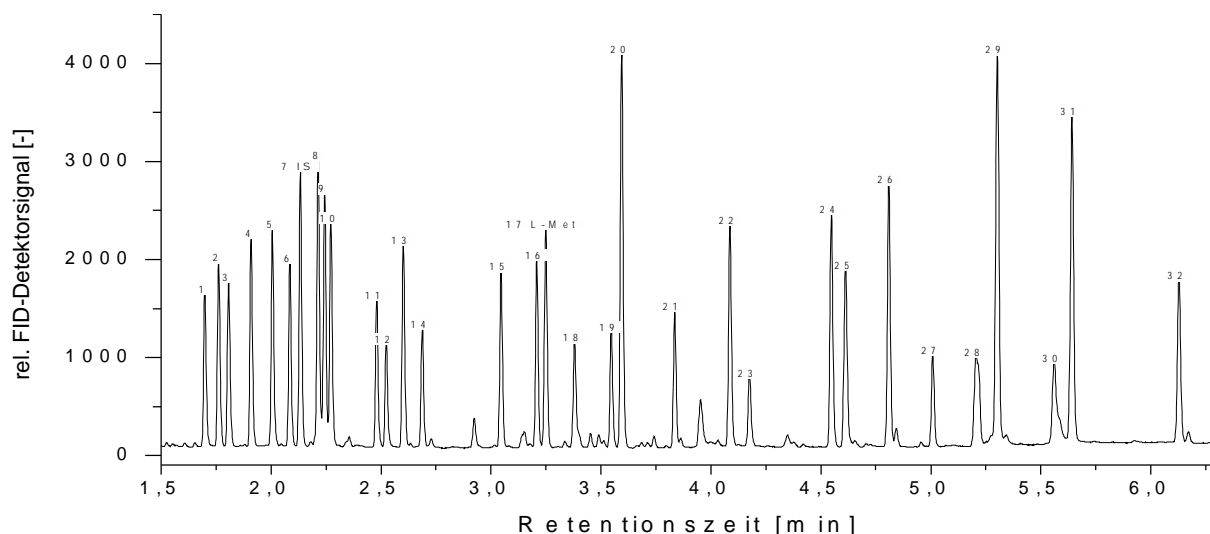
<b>Gerät</b>	<b>Einstellung (Hersteller)</b>
Injektor	250 °C
Detektor (FID)	320 °C
Ofen	110 °C
Probenaufgabesystem Autosampler	AOC 1400
Injektionsvolumen	2 µl
Datenwandler CBM-10A lite	(Shimadzu)
Software ClassGC-10A, V.1.62	(Shimadzu)
Focus-Liner	(SGE)
Säule ZB-AAA 10 m * 0,25 mm GC Column for Amino Acid Analysis	(Phenomenex)
Trägergas	60 kPa Wasserstoff 5.0 1,5 ml/min bei konstantem Druck
Brennigas	Gemisch aus Wasserstoff und Luft 60 kPa Wasserstoff 5.0 50 kPa Luft
Make-up-Gas	75 kPa Stickstoff 5.0
<b>Temperaturprogramm</b>	Start bei 110 °C Rate von 35 °C/min bis auf 250 °C Rate von 30 °C/min bis auf 330 °C Halten von 330 °C für 4 min Gesamtzeit: 8,66 min

Gerät	Einstellung (Hersteller)
<b>Flussrate</b>	
Gesamtfluss	25 ml/min
Split	1:16
	Start bei 24 kPa/min
	Rate von 1 kPa/min bis auf 32 kPa/min
	Rate von -2 kPa/min runter auf 24 kPa/min
	Gesamtzeit: 12 min
Spülzyklus	3x Aufgabe von Aceton

#### 4.5.10.b Gaschromatographie mit dem EZ-faast-Kit

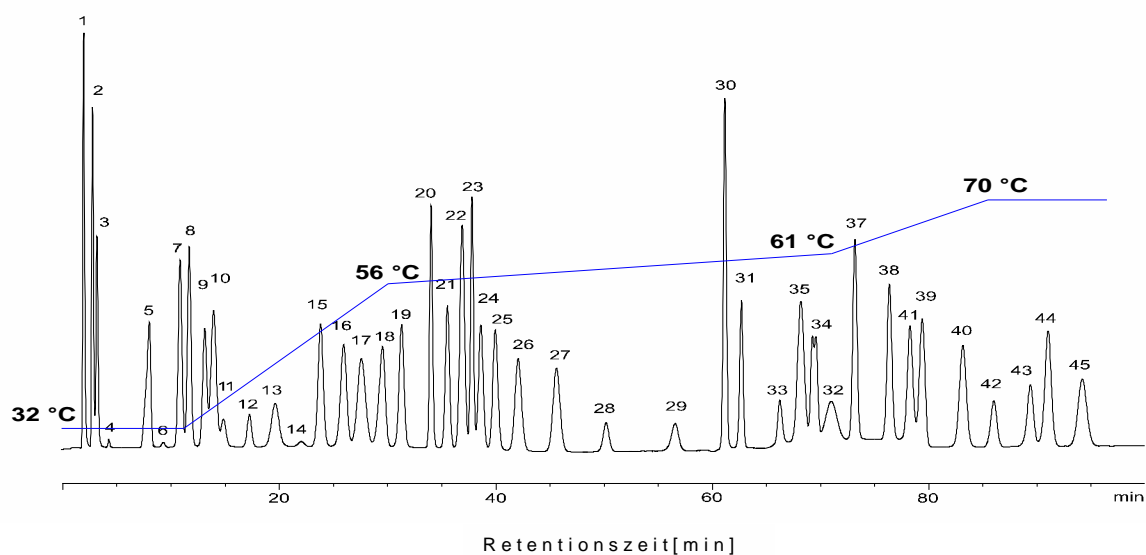
Die Derivatisierung der Proben, die auf ihre Aminosäurezusammensetzung und ihre Konzentration hin untersucht werden sollten, wurde mit dem EZ-FAAST Kit der Firma Phenomenex durchgeführt. Der pH-Wert der Proben wurde auf 3-4 eingestellt und die Proben je nach Bedarf verdünnt eingesetzt. Die Verdünnung erfolgte mit Wasser. Probenvorbereitung und Derivatisierung werden im Anschluss beschrieben:

1. In einem Reaktionsgefäß werden 100 µl Probe mit 100 µl Reagenz 1 versetzt und mit einer Spritze durch den Ionenaustauscher (SPE-Tip) gezogen,
2. durch Aufziehen von 200 µl Reagenz 2 werden unerwünschte Probenbestandteile entfernt; die Waschlösung wird vollständig durch den Tip in die Spritze gezogen und verworfen.
3. Eine neue Spritze wird auf den SPE-Tip gesteckt und 200 µl frisch hergestelltes Elutionsmittel bis zur Barriere hochgezogen. Die nun befeuchteten mit Aminosäuren beladenen Partikel werden vollständig ins Reaktionsgefäß entleert.
4. Mittels Spezialpipette werden dem Reaktionsansatz 50 µl Reagenz 4 zugesetzt. Der Ansatz bleibt nach guter Durchmischung für 10 sek bei 1400 rpm für 2 min stehen. Der Ansatz wird erneut 10 sek bei 1400 rpm durchmischt und 2 min stehengelassen,
5. mit der Spezialpipette werden 100 µl Reagenz 5 zugegeben, 10 sek bei 1400 rpm durchmischt und 1 min stehengelassen; durch Zugabe von 100 µl Reagenz 6 und 10 sek Durchmischung bei 1400 rpm wird die Derivatisierung abgeschlossen.
6. Nach ca. 1 min kann die obere organische Phase, in der sich die freien Aminosäuren befinden, mit einer Pasteurpipette in ein GC-Vial mit Mikroinsert überführt und sofort im GC vermessen oder aber bis zur Vermessung eingefroren werden.



**Abb. 13 a:** Beispiel-Chromatogramm der GC-Vermessung eines Standardgemisches aus je 100  $\mu\text{l}$  SD1, SD2 und SD3 nach Derivatisierung mit dem EZ:faast-Kit. Jede Aminosäure hat eine Konzentration von 200  $\mu\text{mol/l}$  (z.B. ca. 30 mg/l Met).

**Reihenfolge der Aminosäuren:** 1 Alanin, 2 Methylglycin, 3 Glycin, 4  $\alpha$ -Aminobuttersäure, 5 Valin, 6  $\beta$ -Aminobuttersäure, 7 IS-Norvalin, 8 Leucin, 9 allo-I-Leucin, 10 Isoleucin, 11 Threonin, 12 Serin, 13 Prolin, 14 Asparagin, 15 Thioprolin, 16 Asparaginsäure, 17 Methionin, 18 OH-Prolin, 19 Glutaminsäure, 20 Phenylalanin, 21  $\alpha$ -Aminoadipinsäure, 22  $\alpha$ -Aminopimelinsäure, 23 Glutamin, 24 Ornithin, 25 GlycinProlin, 26 Lysin, 27 Histidin, 28 OH-Lysin, 29 Tyrosin, 30 Prolin/OH-Prolin, 31 Tryptophan, 32 Cystathionin.



**Abb. 13 b:** Beispiel-Chromatogramm der HPLC-Vermessung eines Aminosäurestandards. Entnommen aus Pickering Laboratories Method abstract for post-column liquid chromatography, 365 [MA-365-A] [www.pickeringlabs.com](http://www.pickeringlabs.com) (Pickering Laboratories, 2005).

**Reihenfolge der Aminosäuren:** 1. Phosphoserin; 2. Taurin; 3. Phosphoethanolamin; 4. Harnstoff; 5. Asparaginsäure; 6. Hydroxyprolin; 7. Threonin; 8. Serin; 9. Asparagin; 10. Glutaminsäure; 11. Glutamin; 12. Sarcosin; 13.  $\alpha$ -Aminoadipinsäure; 14. Prolin; 15. Glycin; 16. Alanin; 17. Citrullin; 18.  $\alpha$ -Amino-n-Buttersäure; 19. Valin; 20. Cystin; 21. Methionin; 22. Allo-isoleucine; 23. Cystathionin; 24. Isoleucin; 25. Leucin; 26. Tyrosin; 27. Phenylalanin; 28.  $\beta$ -Alanin; 29.  $\beta$ -Amino-i-Buttersäure; 30. Homocystin; 31.  $\gamma$ -Aminobuttersäure; 32. Tryptophan; 33. Ethanolamin; 34. Hydroxylysin; 35. Ammoniak; 36. Kreatinin; 37. Ornithin; 38. Lysin; 39. Histidin; 40. 3-Methylhistidin; 41. 1-Methylhistidin; 42. Anserin; 43. Carnosin; 44. Homocarnosin; 45. Arginin.

Im Beispiel-Chromatogramm der GC-Vermessung eines Standard-Gemisches SD1, 2 und 3 der Firma Phenomenex (Abb. 13 a, S. 44) hat der Interne Standard (IS) Norvalin (7) sein Signal bei 2,13 min, die Aminosäure Methionin (17) liegt bei 3,25 min. Vor einer Retentionszeit von 1,5 min wurden lediglich die Lösungsmittelpeaks, nach einer Retentionszeit von 6,5 min das Ausheizen bzw. Abkühlen der Säule vor Beginn der nächsten Messung abgeschnitten. Nach ca. 20 min ist der GC für die nächste Probenmessung bereit. Eine HPLC-Messung eines Aminosäurestandards (Abb. 13 b) wurde der GC-Vermessung (Abb. 13 a) gegenübergestellt, um die Unterschiede in der Analysenzeit hervorzuheben. In diesem Beispiel wird Methionin erst bei einer Retentionszeit von etwa 35 min detektiert. Um ein komplettes Aminosäurespektrum aufzunehmen bedarf es einer Analysendauer von mehr als 90 min.

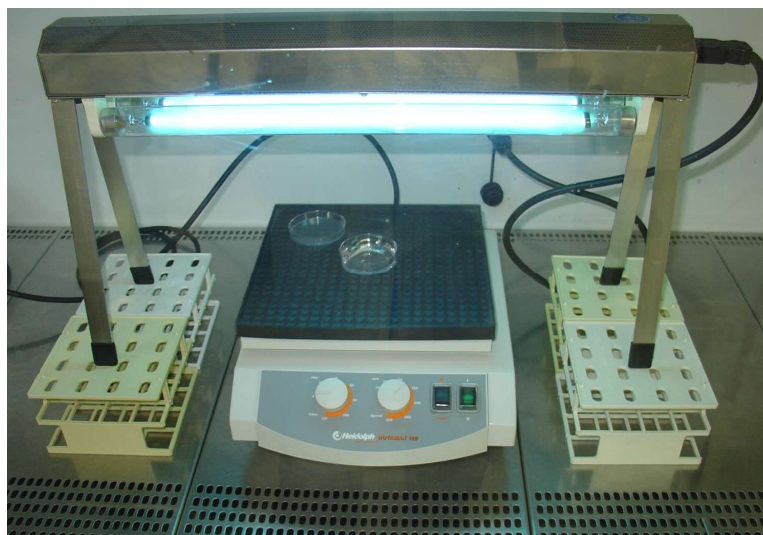
#### **4.5.11 UV-Mutation von *C. glutamicum* DSM 20300**

Neben chemischer Mutagenese ist die UV-Licht induzierte Mutation eine weitere Form der klassischen Mutagenese. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 14 auf S. 46 gezeigt. Die UV-Mutation wurde mit Hilfe eines mobilen UV-Strahlers UVC 30 der Firma Kendro Laboratory Products-GmbH (230 V, 50 Hz, 254 nm, 30 W) durchgeführt. Die Vorbrenndauer betrug 10 min. Es wurde eine Überlebensrate von 0,1 % der Zellen angestrebt; auf einer Agarplatte sollten durchschnittlich 100 Einzelkolonien (EK) mit einer Größe von ca. 1 mm wachsen. Daraus folgt die nachfolgende Vorgehensweise:

- UV-Mutation: Der Wildtyp *C. glutamicum* DSM 20300 wird 32 sek mit UV-Licht bei einem Abstand von 15,4 cm, 125 rpm (Rotamax 120) und einer Schicht von 2 ml Zellsuspension in einer 5 cm-Petrischale mutiert.
- Herstellung der zu mutierenden Zellsuspension: 1x 100 ml Kolben mit Schikane, 20 ml MM2\_2 + 1 Impföse DSM 20300 von 53er Platte (2 cm Spur); Inkubation: 16 h; 30 °C; 150 rpm (Infors)
- Extinktionsmessung und Zellernte: Die Extinktion<sub>600</sub> wird 1:20 mit MM2\_2 verdünnt gemessen und die Suspension auf eine Extinktion<sub>600</sub> von 6,0 eingestellt. Zellernte: Zentrifugation 3 min 5000 g; Resuspendierung des Überstands in 0,1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung (Extinktion<sub>600</sub> von 6,0).

- Herstellung der Positiv-Kontrolle (Wildtyp-EK) für die Bestimmung der Überlebensrate: 1 ml der unmutierten Suspension wird schrittweise bis  $10^{-6}$  verdünnt und 2 Platten mit je 80  $\mu$ l der  $10^{-5}$  und 2 Platten mit der  $10^{-6}$  Verdünnung bespatelt (Positiv-Kontrolle); von jeder Verdünnungsstufe wird ein Volumen von 400  $\mu$ l hergestellt. Die Verdünnungen für die Bestimmung der Überlebensrate und zum Ausplattieren der Mutanten werden mit 0,1 M  $\text{MgSO}_4$ -Lösung hergestellt.
- Herstellung von Mutanten-EK: Von der mutierten Suspension werden je 800  $\mu$ l einer  $10^{-2}$  und  $10^{-3}$  Verdünnung hergestellt. Um genug Mutanten-EK zu erhalten, werden je 100  $\mu$ l der  $10^{-3}$  und  $10^{-2}$  Verdünnung pro 53er Platte ausplattiert (7 Platten pro Stufe). Für eventuelle spätere Plattenausstriche im Verlauf von 2 Wochen werden Reste der unverdünnten mutierten Zellsuspension bei 4 °C aufbewahrt.
- Inkubation: Die Inkubation aller Platten erfolgt für 48 h bei 30 °C; Bestimmung der Überlebensrate durch Auszählen der Mutanten-EK pro Platte im Vergleich zur Positiv-Kontrolle.

Nach einigen Mutationsrunden konnte festgestellt werden, dass bei Einhaltung der oben beschriebenen Prozedur eine Überlebensrate von 0,1-0,3 % der Zellen erzielt werden kann. Die Überlebensrate ist auch von der Fitness der Zellen auf 53er Platte abhängig, die zur Herstellung der DSM 20300 Flüssigkultur verwendet werden.



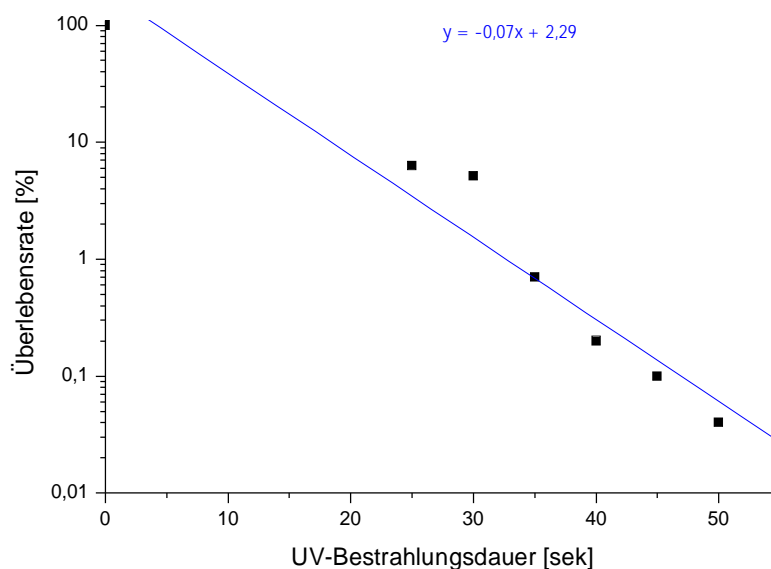
**Abb. 14:** Mutation einer *C. glutamicum* Zellsuspension unter Einwirkung von UV-Licht mittels mobilem UV-Strahler. Der Abstand zwischen Strahler und Zellen ist variabel.

#### 4.5.11.a Zusammenhang von Überlebensrate und UV-Bestrahlung

**Tab. 3:** Überlebensrate der Zellen einer *C. glutamicum* DSM 20300-Zellsuspension in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsdauer bei einer Schichtdicke von 2 ml in einer 5 cm Petrischale und 15,4 cm Abstand zwischen UV-Röhre und Zellen

UV-Bestrahlung [sek]	Überlebensrate [%]
25	6,30
30	5,12
35	0,67
40	0,24
45	0,06
50	0,04

Die UV-Lampe wird kurz vor dem Start der Mutation 10 min vorgeheizt. Bei Versuchsstart mit Anschalten der UV- Lampe werden 3 sek Anlaufzeit berücksichtigt, bevor mittels Stoppuhr die Bestrahlungsdauer startet. Die Daten aus Tab. 3 (S. 47) bilden die Grundlage für die in Abb. 15 auf S. 47 gezeigte exponentielle Absterbefunktion, die bei Zunahme der Bestrahlungsdauer zu erkennen ist. Bei logarithmischer Darstellung ergibt sich eine lineare Regressionsgerade.



**Abb. 15:** Überlebensrate einer DSM20300-Zellsuspension unter Einwirkung von UV-Strahlung. Die Überlebensrate ist über der Bestrahlungszeit aufgetragen; Schichtdicke in einer 5 cm Petrischale ohne Deckel 2 ml, Abstand UV-Röhre zu den Zellen 15,4 cm.

#### **4.5.12 Mikrobiologischer Test mit *E. coli* B834 zum Methionin-Nachweis**

Bei dem Methionin-auxotrophen *E. coli* B834 (Merck Biosciences, Beeston/Nottingham, gentechnisch veränderter Organismus) besteht innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereiches eine Korrelation zwischen dem Grad des Wachstums von *E. coli* B834 (Messung über die Extinktion) und der Met-Konzentration im Wachstumsmedium, d.h. nach Aufnahme einer Kalibrierkurve kann einer gemessenen Extinktion eine bestimmte Met-Konzentration zugeordnet werden.

##### **4.5.12.a Reproduzierbare Herstellung des *E. coli* B834-Inokulums**

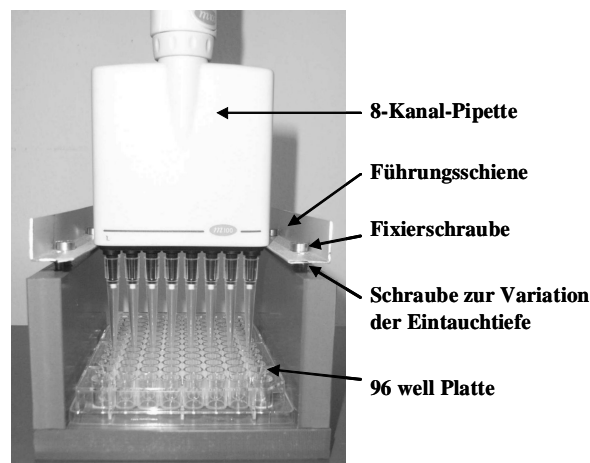
- 2x 100 ml Kolben werden mit je 40 ml Medium 53 befüllt und mit 1 Impföse *E. coli* B834 von 53er Platte angeimpft (2 cm Spur); Inkubation: 17 h, 30 °C, 120 rpm im Brutschrank HT, CTI 3359 (25 mm Rundschüttelbewegung)
- Die Extinktion<sub>600</sub> wird 1:2 verdünnt bestimmt (Soll-Extinktion ca. 0,6). Die Zellsuspension der 2 Kolben wird in 2x 50 ml Falconröhren überführt; Zentrifugation für 3 min 4500 g; der Überstand wird dekantiert und verworfen, anschließend wird das Pellet gewaschen
- 1. Waschschrift: Pellets werden mit 1/5 des Anfangsvolumens 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen, 3 min 4500 g zentrifugiert; der Überstand wird dekantiert und verworfen
- 2. Waschschrift: wie 1. Waschschrift
- Pellets aus den 2 Anfangskolben werden jeweils in 40 ml B74-Medium resuspendiert und die gesamten 80 ml auf 4 neue 100 ml Kolben (ohne Schikane) zu je 20 ml verteilt; zu jedem Kolben werden im Anschluss noch 20 ml B74 zugegeben, um die gewünschte 1:2 Verdünnung zu erzielen; Aushungern: 17 h; 30 °C; 120 rpm
- Kolben werden mit Parafilm verschlossen und dunkel bei 4 °C gelagert. Das *E. coli* B834-Inokulum ist ab jetzt 4-6 Wochen ohne Qualitätsverlust einsatzbereit.

##### **4.5.12.b *E. coli* Test zum Methionin-Nachweis im 96 well Maßstab (Hochdurchsatz)**

- Für den *E. coli* Test im Hochdurchsatz wird die Methode anhand von 4x 96 well Platten im 4-Platten-Schüttelinkubator beschrieben.
- Abtrennung der Zellen: Zentrifugation der 96 well Mutanten-Platten für 5 min bei 5 °C und 5000 g in der Zentrifuge Rotanta 46 RC (Hettich, Tuttlingen)



- Vorbereitung von 4 *E. coli* Testplatten mit frischem *E. coli*-Inokulum: 85 ml B74 werden mit 5 ml MM2\_2 und 5 ml *E. coli*-Inokulum gemischt und mit Hilfe der E-Line-Multi-8-Kanal-Pipette á 190 µl auf die wells der 96 well Platten verteilt
- 5 µl zellfreier Mutanten-Kultivierungsüberstand werden pro well mit Hilfe einer selbstgebauten Mehrkanal-Pipetten-Höhenfixierungsschiene in den *E. coli* Test übertragen (Abb. 16, S. 49); der Schwellenwert liegt bei 10 mg/l Methionin; Reihe D Standards: D1-6 ohne Zusatz (Negativ-Kontrolle), D7-12 + 10 µl eines 5 mg/l Methionin in Wasser Standards (Positiv-Kontrolle)
- Inkubation des Tests: 6 h, 35 °C, 1100 rpm im Thermoshaker; Messung mit Easy Reader bei 550 nm
- Auswertung am PC: Vergleich von Positiv- und Negativ-Kontrolle mit Mutanten



**Abb. 16:** Mehrkanal-Pipetten-Höhenfixierungsschiene; Eigenbau Institut für Technologie (FAL Braunschweig)

#### 4.5.13 Methionin-Analoga Selektion

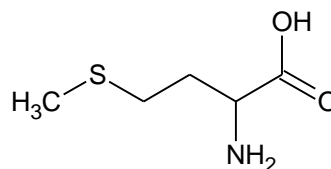
In dieser Arbeit wurde mit folgenden Methionin-Analoga (MA) gearbeitet ( siehe Abschnitt 5.2, S. 72ff.; Tab. 4, S. 50):

- DL-Ethionin und L-Ethionin
- DL-Norleucin und L-Norleucin
- DL-Methioninsulfoxid
- DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid
- N-Acetyl-DL-Methionin
- 1,2,4-Triazol

DL-Methionin

$C_5H_{11}NO_2S$

$M = 149,21 \text{ g/mol}$

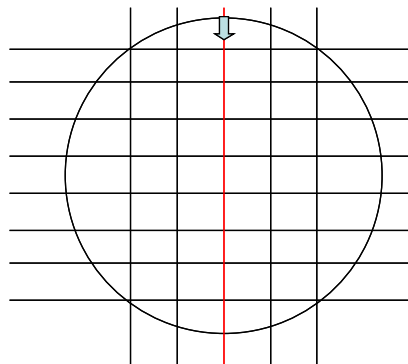


**Tab. 4:** In dieser Arbeit eingesetzte Methionin-Analoga

Methionin-Analogon; Summenformel; Molgewicht	Strukturformel
DL-Ethionin $C_6H_{13}NO_2S$ $M = 163,23 \text{ g/mol}$	
DL-Norleucin $C_6H_{13}NO_2$ $M = 131,17 \text{ g/mol}$	
DL-Methioninsulfoxid $C_5H_{11}NO_3S$ $M = 165,20 \text{ g/mol}$	
DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid $C_6H_{14}ClNO_2S$ $M = 199,69 \text{ g/mol}$	
N-Acetyl-DL-Methionin $C_7H_{13}NO_3S$ $M = 191,25 \text{ g/mol}$	
1,2,4-Triazol $C_2H_3N_3$ $M = 69,06 \text{ g/mol}$	

#### 4.5.13.a Finden der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (MIK)

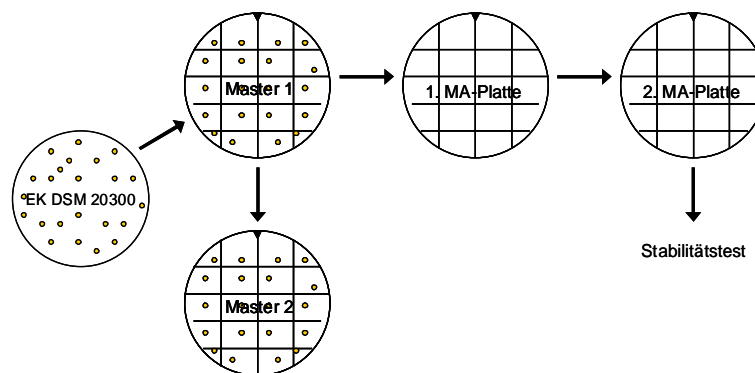
Jedes Analogon wurde in steigender Konzentration beim Wildtyp auf seine Hemmwirkung untersucht (siehe auch Abschnitt 5.2, S. 72ff.). Die Konzentration, bei der kein oder kaum Wachstum mehr sichtbar ist, wurde als Minimale Inhibitorische Konzentration (MIK) dieser Substanz bezeichnet. Dieser für jedes Analogon unterschiedlich hohe Schwellenwert stellte die Basis für die Entwicklung einer Selektionsstrategie dar, mit der Analogon resistente von nicht resistenten Stämmen unterschieden werden könnten. Die Methionin-Analoga wurden dem B74-Plattenmedium nach dem Autoklavieren und der Abkühlung auf ca. 60 °C einzeln oder in Kombination beigemischt. Die Methionin-Analoga-haltigen Platten (MA-Platten) wurden mit Hilfe eines Pickrasters in Felder unterteilt, in die Einzelkolonien (EK) mittels Holzzahnstochern gepickt wurden (Abb. 17, S. 51). Der Pfeil in der Abbildung 17 stellt den Fixpunkt für das Auflegen einer Agarplatte auf die Pickschablone dar und wurde auf dem Plattenboden jeder Agarplatte markiert. Mit diesem Raster sind maximal 50 Pickstellen pro Platte möglich, wobei auch die Randbereiche einbezogen werden.



**Abb. 17:** Pickraster einer Agarplatte für die Selektion von Methionin-Analoga-resistenten Einzelkolonien

Obwohl die Feldgröße bei 50 Quadranten je Platte für je 1 EK ausreichen würde, zeigte der Praxistest, dass durch Kondenswasserbildung leicht eine Vermischung 2er EK aus unterschiedlichen Pickstellen vorkommen konnte. Eine Reduktion auf 20 Pickstellen mit 5 Reihen zu je 4 Feldern verringert die Gefahr von Kreuzkontaminationen (Abb. 18, S. 52). Es wurde eine Medium 53 Platte mit gut gewachsenen EK (Durchmesser ca. 1 mm) des Wildtyps *C. glutamicum* DSM 20300 hergestellt. Ausgehend von dieser EK-Quellplatte, auf der die EK verstreut wachsen, wurden 20 EK mittels Zahnstocher auf 2 B74-Platten mit identischem Pickmuster in 5 Reihen zu je 4 Feldern gepickt (= B74-Masterplatte = Positiv-Kontrolle). Für die erste EK wurde dafür mit einem sterilen Zahnstocher die Zellmasse auf

Position 1 der Masterplatte 1 und mit dem gleichen Zahnstocher und dem verbleibenden Rest Zellmaterial auch auf Position 1 der Masterplatte 2 übertragen. Diese Prozedur wurde mit den verbleibenden 19 EK der Quellplatte durchgeführt, um zwei identische Masterplatten herzustellen. Masterplatte 1 war Ausgangspunkt für Pickversuche auf MA-B74-Platten in verschiedenen Konzentrationen; Masterplatte 2 war die Positiv-Kontrolle für den optischen Vergleich der auf MA-Platten gewachsenen EK mit den EK auf B74-Platte. Bei besonders kleinen EK kam das Stereomikroskop bei der Auswertung des Bewuchses zum Einsatz. Die Standardinkubation für die MA-Platten war 24-48 h bei 20 °C mit anschließender zweiter Überimpfung auf MA-Platten der gleichen Konzentration. Für eine eindeutige Unterscheidung von resistenten von nicht resistenten Kolonien im Vergleich zu den gut gewachsenen Kolonien der Positivkontrolle musste eine als resistent bewertete EK genauso groß wie die EK der Positivkontrolle sein; eine kleine als nicht resistent gewertete EK der MA-Platte musste deutlich kleiner sein als die kleinste EK der Master-Kontrollplatte.



**Abb. 18:** Feststellung der MİK von Methionin-Analoga mit Hilfe von Platten-Tests

#### 4.5.13.b Selektion Methionin-Analoga resistenter Mutanten und Stabilitätstest

Nach Auffinden der MİK (siehe auch Abschnitt 5.2, S. 72ff.) von geeignet erscheinenden Methionin-Analoga (MA) erfolgte die Anwendung auf DSM 20300-Mutanten in Form einer MA-Selektionsstrategie. Die Resistenz der Mutanten musste nicht nur nach zweimaligem Überimpfen auf MA-Platten gegeben sein, sondern es wurde ein Stabilitätstest zwischengeschaltet, in welchem den Mutanten auf B74-Platten die Gelegenheit zum MA-freiem Wachstum gegeben wurde (Erholungsphase). Im Anschluss erfolgten zwei weitere Selektionsschritte auf MA-Platten. Nur die nach dem 4. MA-Platten Schritt noch resistenten Mutanten wurden auf Medium 53 Platten zellvermehrt und im Produktionsmedium auf Methionin-Bildung getestet.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Medienoptimierung von *C. glutamicum* DSM 20300

#### 5.1.1 B74-Medium

Die Medienentwicklung ging von B74 über MM1 zu MM2 und schließlich MM2\_2 als Screening- und Produktionsmedium. Medium 53 stellte in dieser Arbeit das komplexe Stammhaltungsmedium dar und wurde auch zu Vergleichszwecken in Versuchen herangezogen (Abschnitt 4.2, S. 20ff.). In einer Arbeit von A. K. Banik und S. K. Majumdar (Banik, A.K. and Majumdar, S.K., 1974) wurde ein Minimalmedium beschrieben, das als Screening- und Fermentationsmedium für den Stamm *C. glutamicum* DSM 20300 (=ATCC 13032) zur Methioninüberproduktion eingesetzt wurde. Mit dem Medium wurden in der Arbeit von Banik 1974 Methionin-Produktionen von bis zu 3 g/l im Kulturüberstand beschrieben. Dieses Medium stellte die Grundlage für Versuche mit dem Wildtyp von DSM 20300 (Abschnitt 4.2.2, S. 20ff.) dar und wurde in Anlehnung an diese Arbeit B74 genannt. Die Schwefelquelle ist Magnesiumsulfat-Heptahydrat in einer Konzentration von 250 mg/l (32,5 mg reiner Schwefel) und wird ergänzt von einer 0,5 M Schwefelsäure (162,0 mg reiner Schwefel), die zur Einstellung des pH-Wertes eingesetzt wurde. Die Wachstumsversuche mit DSM 20300 in B74-Medium sind in Tab. 5 auf S. 54 zusammengefasst. Die ersten Versuche wurden in Reagenzgläsern und 100 ml Schüttelkolben ohne Schikane durchgeführt. Zur Animpfung wurden Agarplatten mit Medium 53 verwendet, wobei es zu einer Einschleppung von komplexen Mediumbestandteilen kommen konnte. Die Animpftechnik mittels Holzzahnstochern erleichterte das Animpfen in Reagenzgläsern, da der Zahnstocher für die Dauer der Inkubation im Kultivierungsgefäß verblieb. Im Reagenzglas-Maßstab konnten bei einer Befüllung von 5 ml B74 Medium und einem 1 cm Magnetrührkern pro Reagenzglas bei einer Inkubation von 24-28 h bei 30 °C im Klimaschrank und 700 rpm Rührgeschwindigkeit (IKA-Magnetrührer) Extinktionen<sub>600</sub> von 0,8 bis 1,2 erzielt werden, wenn für die Animpfung ein Holzzahnstocher benutzt wurde. Im 100er Schüttelkolben ohne Schikane konnten bei einer Befüllung von 20 ml je nach Animpfmenge nach 24 -28 h, 30 °C und 150 rpm Extinktionen<sub>600</sub> bis 2,0 erreicht werden, wenn 1 Zahnstocher pro Gefäß mit inkubiert wurde. Es machte einen großen Unterschied, ob von Platte oder von flüssiger Vorkultur angeimpft wurde.

**Tab. 5:** Wachstum von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp in B74 Medium im Reagenzglas mit Rührkern und im 100 ml Schüttelkolben ohne Schikane

<i>Reagenzglasversuche</i>			
<b>Animpfmateri al Animpftechnik</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Wuchsverbesserung durch Erhöhung der Rührerdrehzahl</b>	<b>Wuchsverbesserung durch Verringerung des Füllvolumens</b>
von 53er Platte mit Impföse	-	-	-
von 53er Platte mit Zahnstocher	ja	ja, von 300 auf 700 rpm	ja, von 7 ml bis hin zu 5 ml
von 53er Platte mit Plastikpipettenspitze	-	-	-
von B74-Platte mit Impföse	-	-	-
Von B74-Platte mit Zahnstocher	ja	ja, von 300 auf 700 rpm	ja, von 7 ml bis hin zu 5 ml
von B74- Platte mit Plastikpipettenspitze	-	-	-
<i>Kolbenversuche</i>			
<b>Animpfmateri al Animpftechnik</b>	<b>Wachstum</b>	<b>Wuchsverbesserung durch Erhöhung der Schüttelfrequenz</b>	<b>Wuchsverbesserung durch Verringerung des Füllvolumens</b>
von 53er Platte mit Impföse	-	-	-
von 53er Platte mit Zahnstocher	ja	ja, von 120 auf 180 rpm	ja, von 50 ml bis hin zu 20 ml
von 53er Platte mit Plastikpipettenspitze	-	-	-
von B74-Platte mit Impföse	-	-	-
Von B74-Platte mit Zahnstocher	ja	ja, von 120 auf 180 rpm	ja, von 50 ml bis hin zu 20 ml
von B74- Platte mit Plastikpipettenspitze	-	-	-

Die Prozedur im Reagenzglas-Maßstab mit 5 ml B74, 1 Rührkern und 1-3 Einzelkolonien per Zahnstocher angeimpft für 24-28 h, 30 °C und 700 rpm im Klimaschrank war der erste Schritt der Miniaturisierung der Mutantenkultivierung für die Entwicklung eines Hochdurchsatzscreenings zum Auffinden Methionin-überproduzierender mutierter Stämme von DSM 20300. Eine Kultivierung von Mutanten im Reagenzglas ermöglichte einen deutlich größeren Durchsatz als eine Schüttelkolbeninkubation, allerdings mit End-Extinktionen<sub>600</sub> von nur maximal 1,2 durch den begrenzten Sauerstoffeintrag im Reagenzglas (kleine Oberfläche, Sauerstoffeintrag nur durch Rührkernbewegung). Anhand von Tabelle 5 (S. 54) fällt auf, dass ausschließlich die Versuche mit Holz-Zahnstocher anwuchsen, die

Versuchsansätze mit alternativen Animpftechniken nicht. Dies ließ die Vermutung zu, dass durch das Holz der Zahnstocher Medienbestandteile in das B74-Medium eingeschleppt wurden, die das Wachstum von DSM 20300 deutlich förderten. Bei dem Holz der Zahnstocher handelt es sich laut Auskunft der Firma Pap Star (Kall) um chinesisches Birkenholz. Holz enthält neben den Hauptbestandteilen Zellulose (40-60 %), Hemizellulose (18-32 %) und Lignin (28-30 %) noch ca. 6 % weitere Inhaltsstoffe, die je nach Holzsorte in Art und Anteil differieren. Unterschieden werden Harze, Fette, ätherische Öle, Gerbstoffe, Alkaloide (Chinin, Strychnin u.a.), Farbstoffe, Phenole und andere. Phenole sind chemische Verbindungen, die aus einem aromatischen Ring und einer oder mehrerer daran gebundener Hydroxylgruppen bestehen. Sie reagieren wegen der Dissoziierbarkeit ihrer OH-Gruppe sauer. Es handelt sich um relativ reaktive Substanzen. Eine wichtige Eigenschaft der Phenole ist ihre Fähigkeit, mit Metallen Chelatkomplexe einzugehen. Liebl untersuchte 1989 den Einfluss von chelatbildenden Substanzen auf das Wachstum von *C. glutamicum* in synthetischen Medien (Liebl, W. et al., 1989) und konnte in Anlehnung an Arbeiten von Nakayama aus dem Jahr 1964 bestätigen, dass einige Substanzen das Wachstum der Zellen deutlich förderten. Es fiel besonders die phenolische Substanz 3,4-Dihydroxybenzoesäure (=Protocatechusäure) auf, die als Komplexbildner für Eisen fungiert. Sie erlaubte einen erleichterten Eisentransport ins Zellinnere und führte zu verbessertem Wachstum. Es könnte sein, dass eben diese Substanz im Holz der Zahnstocher, die zum Animpfen verschiedener Kulturen eingesetzt wurden, vorkommt und damit das gesteigerte Wachstumsverhalten der Zellen erklärbar macht. Daneben könnten Produkte der Maillard-Reaktion Einfluss auf das Wachstum gehabt haben. Die nach dem Chemiker Louis Camille Maillard benannte Maillard-Reaktion ist eine nicht-enzymatische Bräunungsreaktion, bei der Aminosäuren und reduzierende Zucker unter Hitzeeinwirkung zu neuen Verbindungen umgewandelt werden. Dies passiert beim Autoklavieren von Glucose zusammen mit anderen Aminogruppenhaltigen Mediumbestandteilen und kann gemeinsam mit dem Karamellisieren auftreten. Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen und theoretischen Erwägungen heraus wurde das B74-Medium als Screening- und Produktionsmedium für unbrauchbar befunden. Hauptproblem war der zu geringe Schwefel-Anteil, der eine Methionin-Produktion von nur unter 1 g/l im Maximum ermöglichen würde. Die Schwefel-Problematik wurde bereits in Abschnitt 3.5 (S. 16ff.) erläutert. Daneben ist Harnstoff als alleinige Stickstoffquelle fragwürdig aufgrund von zwei Teilproblemen:

1. Harnstoff hat Reservoirfunktion; die Zellen können den Stickstoff nur allmählich durch enzymatischen Abbau in Ammonium und Kohlendioxid verfügbar machen. Um das dafür benötigte Enzym Urease zu bilden, vergeht Zeit und der Erhaltungsstoffwechsel braucht Nahrung, die in einem nährstoffarmen Minimalmedium wie B74 ohne alternative Stickstoffquelle nicht zur Verfügung steht. Es kommt zu einer langen lag-Phase (Anlaufphase).
2. Harnstoff und Wasser reagieren in Abhängigkeit von der Temperatur und des pH-Wertes zu  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$ . Das Gleichgewicht verschiebt sich bei steigender Temperatur und steigendem pH-Wert in Richtung der Ammoniak-Bildung (Willke, T., 1997). Bei 121 °C Autoklaviertemperatur geht mindestens 50 % des Stickstoffs in Form von Ammoniak verloren. Darüber hinaus ist Ammoniak bis zu einem bestimmten Grad in Wasser löslich und wirkt bei Nitrifizierern ab einer Konzentration von etwa 10 mg/l toxisch. Die Wirkung als Zellgift könnte auf andere Mikroorganismen übertragbar sein.

### **5.1.2 Entwicklung von MM1**

Es wurde angestrebt, ein minimales Wachstumsmedium herzustellen, dass die positiven Eigenschaften des B74-Mediums mit dem Wissen um Einschleppung komplexer Medienbestandteile aus Medium 53 und der wachstumsfördernden Eigenschaften des Zahnstocherholzes in sich vereint. Das Medium sollte ohne Zahnstocherholz und unabhängig von der Vorkultur ein gutes und reproduzierbares Wachstum erzielen und wurde Minimalmedium MM1 genannte. Durch Sterilfiltration der Glucose wurde die Maillard-Reaktion verhindert, so dass MM1 klar wie Wasser war im Gegensatz zum gelblichen Farbton des B74-Mediums. Das B74-Medium (Abschnitt 4.2.2, S. 20ff.) wurde dahingehend verändert, dass das Magnesiumsulfat durch Ammoniumsulfat und Ammoniumthiosulfat als Schwefelquelle für Zellwachstum und mögliche Methionin-Überproduktion ersetzt wurde (Abschnitt 4.2.3, S. 23ff.); gleichzeitig wurde Harnstoff als Stickstoff-Reservoir ersetzt. Die Konzentrationen von Biotin und Kaliumdihydrogenphosphat wurden beibehalten; zusätzlich wurden noch Calcium und Magnesium eingebracht in Form von Chloriden. Das Magnesium aus Magnesiumsulfat-Heptahydrat in B74 wurde durch Magnesiumchlorid in MM1 ersetzt, um das Ausfallen von schwer löslichem Magnesiumphosphat in Kombination mit

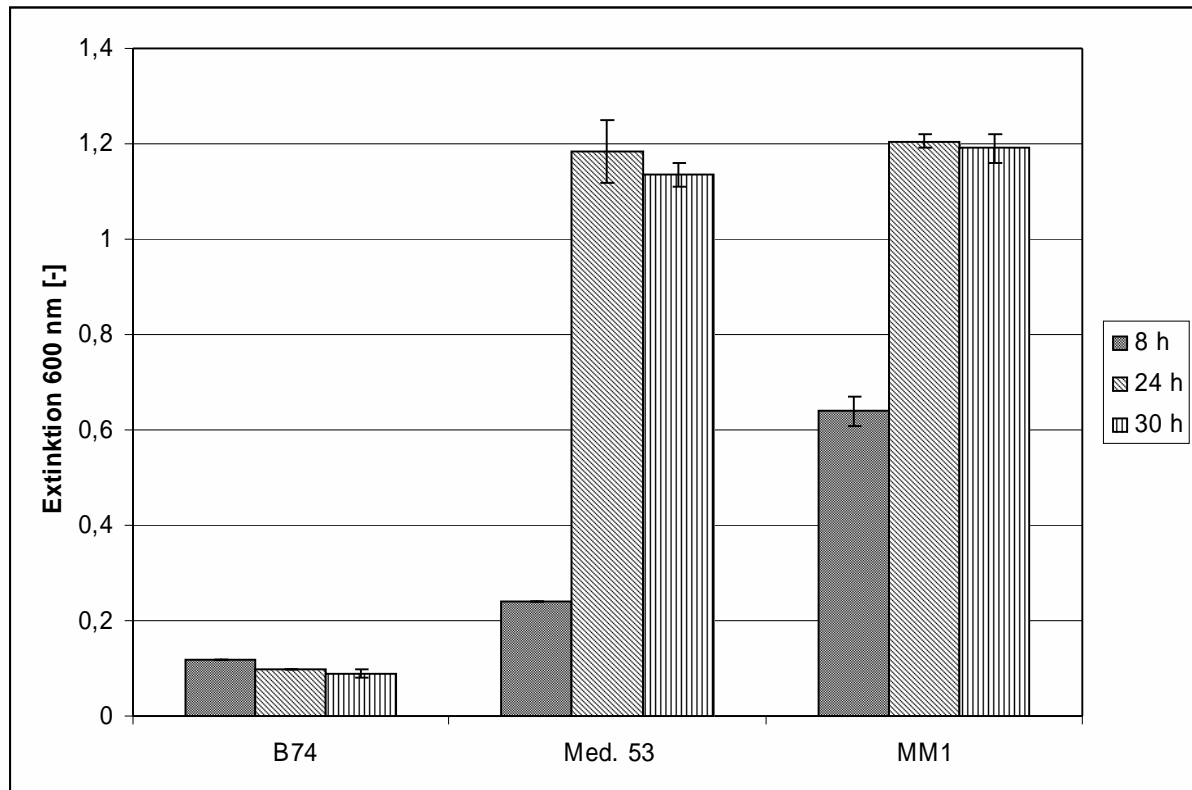


Kaliumdihydrogenphosphat zu vermeiden. Der Glucose-Gehalt wurde deutlich gesenkt, um störende Effekte durch einen Überschuss an Zucker zu vermeiden.

#### **5.1.2.a Versuchsergebnisse mit MM1**

Die Verbesserung gegenüber dem B74-Medium bestand darin, dass die Zellen in MM1 ohne den Einfluss von Zahnstocherholz und Einschleppung von einer Medium 53 Platte nach 24 h sowohl im Reagenzglas als auch im Kolben mit und ohne Schikane bis zu einer Extinktion<sub>600</sub> 0,6 heranwuchsen. Es wurde eine B74-Vorkultur einer Extinktion<sub>600</sub> von 0,6 eingesetzt. Das Wachstum stoppte dann aber und konnte nicht durch Veränderung der Parameter Zeit, Temperatur, Inokulum o. Ä. verbessert werden. Das deutet auf das Fehlen von einer oder mehrer Komponenten für das Wachstum hin. Um zu prüfen, ob eine Einschleppung von Medium 53 oder Holzzugabe das Wachstum steigert, wurden zum einen eine MM1-Hauptkultur mit einer Medium 53 Vorkultur beimpft. Ergebnis war eine Verbesserung der Extinktion<sub>600</sub> nach 24 h von 0,6 auf 0,8. Der zweite Versuch war eine Inkubation einer von MM1-Vorkultur angeimpften MM1-Hauptkultur, in der ein Holzzahnstocher mit inkubiert wurde. Ergebnis war eine weitere Verbesserung des Wachstums von Extinktion<sub>600</sub> 0,8 auf 1 nach 24 h. Da es sich in beiden Fällen nur um eine geringe Verbesserung handelte, lag die Schlussfolgerung nahe, dass es sich bei den fehlenden Mediumsbestandteilen um Spurenelemente und Vitamine handelt, die auch in der Einschleppung von Medium 53 und in der geringen Menge zugegebenem Holz nicht der optimalen Dosierung für *C. glutamicum* entsprachen. Um zu demonstrieren, wie groß der Einfluss komplexer Einschleppungen auf das Wachstum in einem Minimalmedium im Vergleich zum Wachstum in einem Komplexmedium ist, wurde ein Vergleichsversuch gestartet, in welchem Vorkultur- und Hauptkulturmedium identisch waren (Abb. 19, S. 58). Eine aus B74-Vorkultur angeimpfte B74-Hauptkultur wächst gar nicht, da Wuchsstoffe fehlen. Eine aus einer Medium 53 Vorkultur angeimpfte Medium 53 Hauptkultur und eine aus MM1 Vorkultur angeimpfte MM1 Hauptkultur wachsen nahezu identisch bis zu einer End-Extinktion<sub>600</sub> von ca. 1,2 nach 24 h. Einziger Unterschied ist die Wachstumsgeschwindigkeit in den beiden Medien. In dem komplexen Medium 53 ist die lag-Phase etwas länger als in MM1-Medium. Nach 8 h Inkubation befindet sich die Hauptkultur in MM1 bereits bei einer Extinktion von 0,6, während die Medium 53 Hauptkultur erst eine Extinktion von knapp über 0,2 aufweist. Die End-Extinktion<sub>600</sub> im Verlauf einer Wachstumskurve ist stark abhängig von der Qualität des

Inokulums, d.h. welche Extinktion<sub>600</sub> das Inokulum hatte und welche Qualität (Alter, Temperatur) die Zellen auf Medium 53 Platte hatten, von der die Vorkultur angeimpft wurde.



**Abb. 19:** Direkter Vergleich des Wachstums von *C. glutamicum* DSM 20300 in 2 Minimalmedien (B74 und MM1) und einem Komplexmedium (53). Die Vorkultur wurde jeweils auf eine Extinktion<sub>600</sub> von 1,0 eingestellt; es wurde mit 10 % Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde im Doppelansatz in 100 ml Schikanekolben (Gesamtvolumen 20 ml) über 30 h bei 32 °C und 180 rpm inkubiert. Jeder Messpunkt wurde aus 2 Einzelwerten gewonnen.

### 5.1.2.b Versuchsergebnisse mit MM1\_1

Im MM1\_1 Medium (Abschnitt 4.2.3.a, S. 24) wurden die Vitamine Thiamin und Vitamin B12 und die Mineralien Eisen und Mangan zugesetzt. Eine von MM1\_1-Vorkultur mit der Extinktion<sub>600</sub> von 1,0 angeimpfte MM1\_1-Hauptkultur hatte nach 24 h Inkubation eine Extinktion<sub>600</sub> von 1,2. Dieser Wert ließ sich aber nicht durch Veränderung äußerer Parameter steigern, d.h. die zugesetzten Vitamine und Mineralien förderten zwar in geringem Maße das Wachstum, konnten aber keinen deutlichen Wachstumsschub bewirken. Es wurde

auch der Einfluss vom Zahnstocherholz auf drei Medien im Vergleich (53, MM1\_1 und B74) getestet, wenn als Vorkultur allgemein eine Zellsuspension in MM1\_1 eingesetzt wurde.

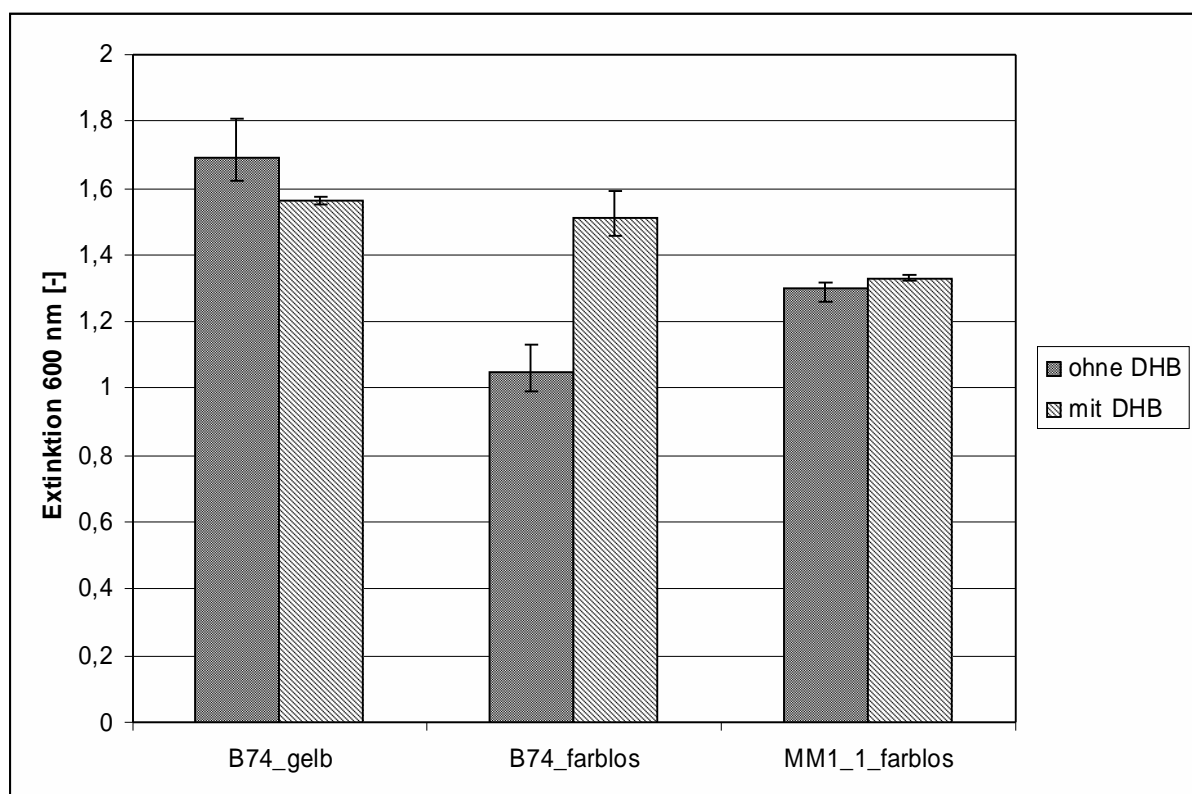
**Tab. 6:** Einfluss von Holzextrakt auf das Wachstum von *C. glutamicum* DSM 20300 in den Medien 53, MM1\_1 und B74. Die Vorkultur war für alle drei Versuchsansätze MM1\_1 mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 0,84. In der Hauptkultur wurden 8 % Vorkultur als Inokulum eingesetzt in Dreifachansätzen von 100 ml Kolben (ohne Schikane) und einem Füllvolumen von 20 ml. Inkubation 24 h, 30 °C, 150 rpm. Jeder Kolben mit Zahnstocher enthielt 4 einmal in der Mitte durchgebrochene Zahnstocher.

	<b>Extinktion [-] 600 nm ohne Zahnstocher</b>	<b>Extinktion [-] 600 nm mit Zahnstocher</b>
Medium 53	2,02	3,67
	2,02	3,67
	2,02	3,78
MM1_1	1,20	1,22
	1,24	1,26
	1,28	1,24
B74	2,69	6,02
	2,80	6,29
	2,80	6,29

Aus der Tabelle 6 (S. 59) geht hervor, dass es in Medium 53 (braun durch Maillard-Reaktion) und in B74-Medium (gelb durch Maillard-Reaktion) eine deutliche Wachstumsverbesserung bei Zugabe von Holz gab. In Medium 53 kam es zu einer knappen Verdopplung, in B74-Medium sogar zu mehr als einer Verdopplung der Extinktion<sub>600</sub>. In dem farblosen MM1\_1-Medium, in welchem keine Maillard-Reaktion stattfand, gab es keinen positiven Einfluss durch das Zahnstocherholz. Dies deutet auf ein Zusammenspiel zwischen den Produkten der Maillard-Reaktion und den u. a. aus dem Holz ins Medium abgegebenen phenolischen Substanzen bei der Wachstumsverbesserung von *C. glutamicum* hin. In MM1\_1 fehlten phenolische Substanzen.

### 5.1.2.c Versuchsergebnisse mit MM1\_2

Das in Abschnitt 4.2.3.b auf S. 24 definierte MM1\_2-Medium entstand in Anlehnung an die Arbeit von Liebl 1989. Dem MM1\_1-Medium wurde 3,4-Dihydroxybenzoesäure in einer Endkonzentration von 15 mg/l zugesetzt. Um zu prüfen, ob diese phenolische Substanz unabhängig von der Maillard-Reaktion einen positiven Einfluss auf das Wachstum von *C. glutamicum* hat, wurden im Vergleich B74\_gelb (Glucose-Lösung autoklaviert), B74\_farblos (Glucose-Lösung sterilfiltriert) und MM1\_1\_farblos (Glucose-Lösung sterilfiltriert) in einer Hauptkultur getestet, die mit einer MM1\_1 Vorkultur beimpft wurde (Abb.20, S. 60).



**Abb. 20:** Einfluss von 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB) auf das Wachstum von *C. glutamicum* DSM 20300 in den Medien B74\_gelb, B74\_farblos und MM1\_1\_farblos in Abhängigkeit von der Maillard-Reaktion. Die Hauptkulturen aller Versuchsvarianten wurden mit 8 % einer Vorkultur in MM1\_1 Extinction<sub>600</sub> von 1,0 inokuliert; es handelte sich um 3fach Ansätze in 100 ml Kolben (ohne Schikane) mit einem Füllvolumen von 20 ml. Inkubation 24 h, 30 °C, 150 rpm.

Nur im Fall des farblosen B74-Mediums hatte 3,4-Dihydroxybenzoesäure einen deutlich positiven Einfluss auf das Wachstum der Zellen; die Extinction<sub>600</sub> konnte von ca. 1,0 auf 1,5 gesteigert werden. In B74\_gelb und MM1\_1\_farblos war kein Einfluss zu erkennen. Im Fall

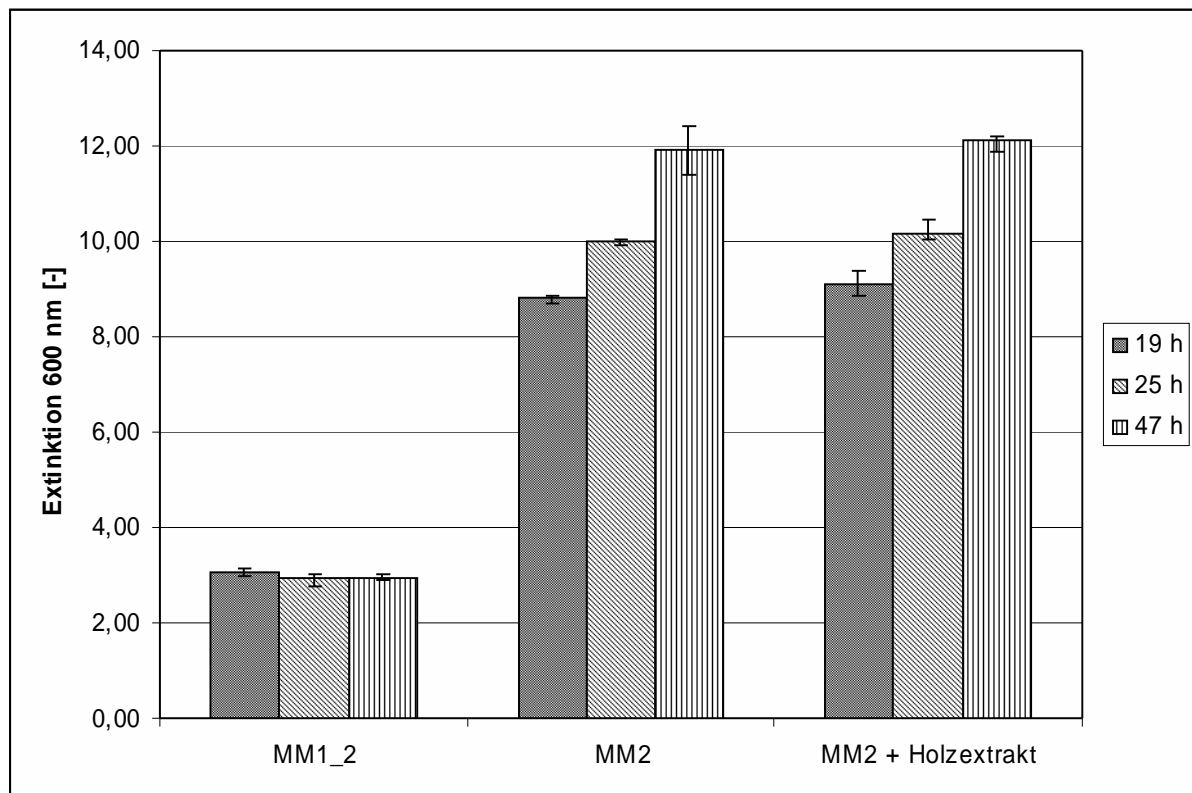
des gelben B74 liegt die Vermutung nahe, dass die Produkte der Maillard-Reaktion die Wirkung der 3,4-Dihydroxybenzoesäure überdecken bzw. übertreffen. B74 kam wegen der mangelnden Reproduzierbarkeit der gelben Färbung nicht für eine Medienoptimierung in Frage; die farblose Variante des B74 zeigte keine deutlich bessere Extinktion als MM1\_1 bei Zugabe von 3,4-Dihydroxybenzoesäure. Da aus der Literatur bekannt ist, dass der Stamm DSM 20300 in Minimalmedien eine BTM von z.B. 8 g/l erreichen kann (Sharma, S., 2001), was einer Extinktion<sub>600</sub> von ca.10 entspricht und B74\_farblos und MM1\_1 farblos ähnliche End-Extinktionen von nur 1,3-1,5 in diesem Versuch erzielten, war es unerheblich, welches der beiden Medien als Grundlage für weitere Schritte der Medienoptimierung herangezogen wurde. Da ein Zwischenziel dieser Arbeit die Entwicklung eines definierten reproduzierbar herstellbaren Minimalmediums für das Screening und die Kultivierung von Methionin-Überproduzenten war, wurde die Zusammensetzung des MM1\_2 als Grundlage für weitere Medienoptimierungen genutzt.

### **5.1.3 Entwicklung von MM2**

Bei der Zusammensetzung des MM2-Mediums (Abschnitt 4.2.4, S. 25ff.) bildeten B74 und MM1\_2 die Grundlage und wurden ergänzt durch Medienkomponenten aus den Arbeiten von Liebl 1989 (BMCG-Medium (Liebl, W. et al., 1989)) und Keilhauer 1993 (CGXII-Medium (Keilhauer, C. et al., 1993)). Der Phosphatpuffer wurde aufgestockt und die Konzentration von Eisensulfat verdoppelt. 3,4-Dihydroxybenzoesäure wurde ebenfalls integriert, auch wenn in den Versuchen mit MM1\_2 weder eine positive noch negative Wirkung erkennbar war. Die Substanz dient als Sicherheitsreserve für einen guten Eisentransport in die Zellen. In Anlehnung an das B74-Medium wurde Harnstoff neben dem Stickstoff aus Ammoniumsulfat und Ammoniumthiosulfat als Stickstoff-Reservoir hinzugenommen. Die Konzentration der Spurenelemente wurde so berechnet, dass sie für die Bildung von mindestens 8 g/l BTM bei *C. glutamicum* ATCC 13032 ausreichen würde. Die elementare Zusammensetzung der Zellen für die Bildung von 1 g BTM wurde der Tabelle 2.1, S. 18 im Handbook of *Corynebacterium glutamicum* entnommen (Eggeling L. and Bott M., 2005).

### 5.1.3.a Versuchsergebnisse mit MM2 im Vergleich zu Medium 53

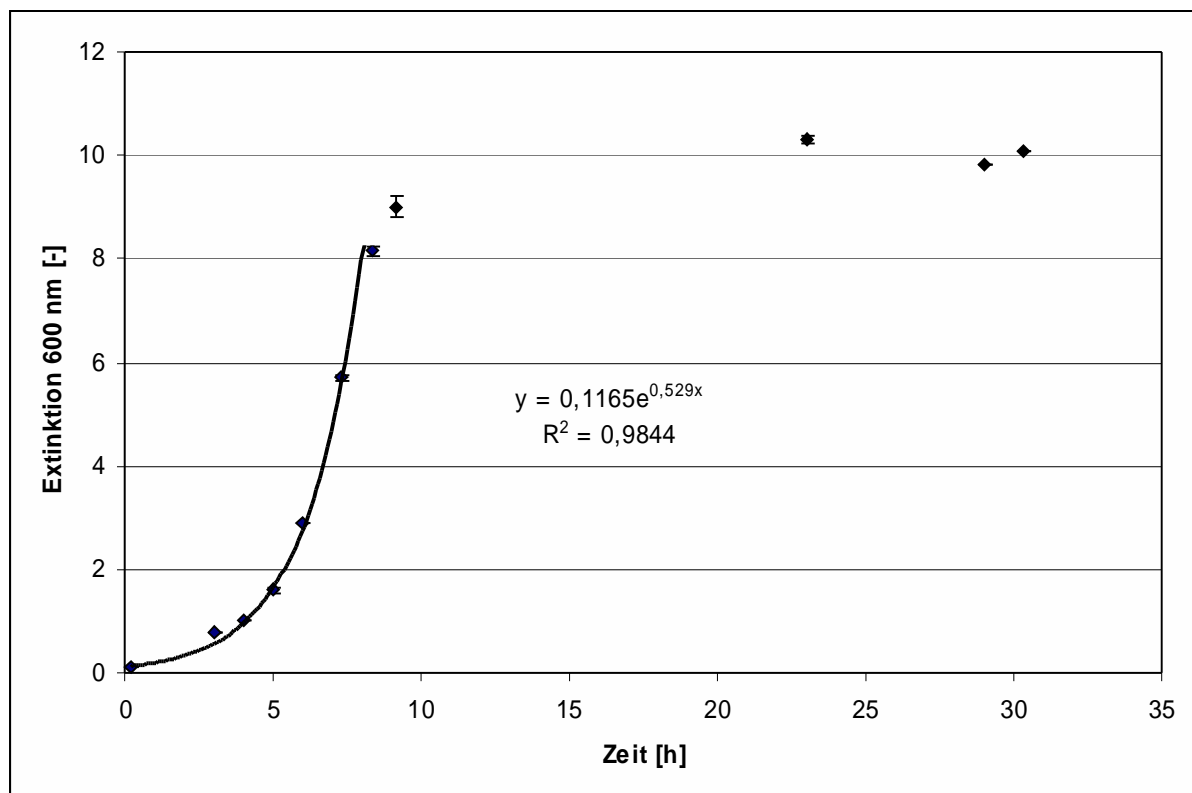
Das MM2-Medium ist bestens für die Kultivierung von *C. glutamicum* geeignet (Abb. 21, S. 62). Eine Zugabe von Holzextrakt führte nicht zu einer Wachstumsverbesserung, d.h. die Medienbestandteile sind besser als die komplexen Bestandteile aus dem Holz. Über begleitende HPLC-Messung der verbleibenden Glucose-Konzentration im Medium MM2 (keine Abnahme mehr) im Verlauf der Kultivierung konnte festgestellt werden, dass die Messpunkte zu 25 und 47 h bereits im Übergangsbereich zwischen Ende der exponentiellen Phase und der Stationärphase des Wachstums liegen.



**Abb. 21:** Vergleich der Medien MM1\_2, MM2 und MM2 bei Zugabe von Holzextrakt und 8 %iger Inokulation durch eine MM2-Vorkultur der Extinction<sub>600</sub> von 4,5. Das Wachstum der 3fach Ansätze in 100 ml Kolben ohne Schikane mit einem Füllvolumen von 30 ml wurde im Verlauf von 48 h bei 30 °C und 150 rpm untersucht.

Das Wachstum in MM2\_2-Medium, das eine vereinfachte Variante von MM2-Medium darstellt (Abschnitt 4.2.5, S. 27), kann durch eine Veränderung folgender Parameter weiter optimiert werden:

- Geeignete Extinktion der Vorkultur (VK) in der exponentiellen Phase
- Inkubationsdauer
- Erhöhung des Sauerstoffeintrags über Einstellung der Schüttelfrequenz, das Füllvolumen im Kolben und den Einfluss von Schikanen



**Abb. 22:** Wachstumskurve von *C. glutamicum* DSM 20300 in MM2\_2; jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus 2 Extinktionswerten. Die Hauptkultur im Doppelansatz wurde mit 10 % einer MM2\_2-Vorkultur mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 1,3 inokuliert. Die Inkubation erfolgte in 100 ml Schikanekolben mit einer Befüllung von 20 ml bei 30 °C und 180 rpm.

Das Wachstum von DSM 20300 Wildtyp startet in MM2\_2-Medium direkt nach Beimpfung; es gibt keine lag-Phase (Abb. 22, S. 63). Der exponentielle Bereich der Wachstumskurve verläuft bis etwa Extinktion<sub>600</sub> 8,0. Die Verdopplungszeit  $t_d$  in dem Medium MM2\_2 beträgt 80 min. Die exponentielle Wachstumsrate  $\mu$  berechnet sich wie folgt:

$$\mu = (\ln x_t - \ln x_0) / (t - t_0)$$

$$t_d = (\ln 2 / \mu)$$

$x_0$	Extinktion <sub>600</sub> zu Beginn der exponentiellen Phase
$x_t$	Extinktion <sub>600</sub> zum Zeitpunkt t innerhalb der exponentiellen Phase
$t_0$	Startzeitpunkt der exponentiellen Phase [h]
t	Zeitpunkt t innerhalb der exponentiellen Phase [h]
$t_d$	Verdopplungszeit

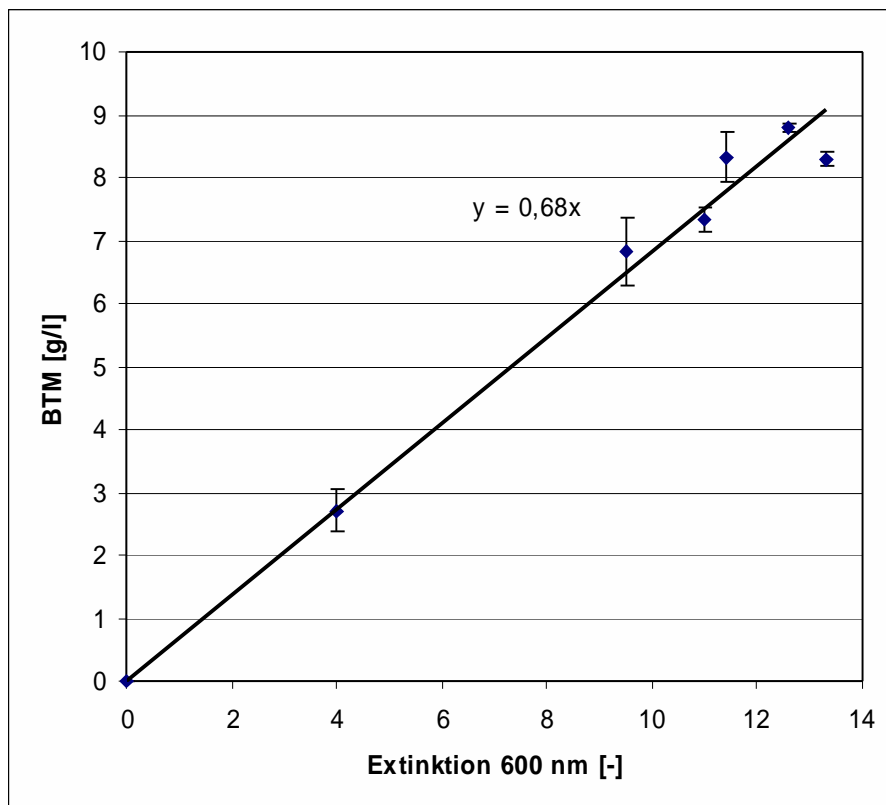
Die exponentielle Wachstumsrate  $\mu$  wurde aus den Zeitpunkten  $t_0 = 6$  h;  $t = 7,33$  h und den Extinktionen  $x_0 = 2,90$  und  $x_t = 5,80$  berechnet und beträgt  $0,53 \text{ [h}^{-1}\text{]}$  in MM2\_2, kann aber auch aus der exponentiellen Funktionsgleichung in Abb. 22 (S. 63) abgelesen werden.



### 5.1.3.b Korrelation von optischer Dichte und Biotrockenmasse in MM2\_2

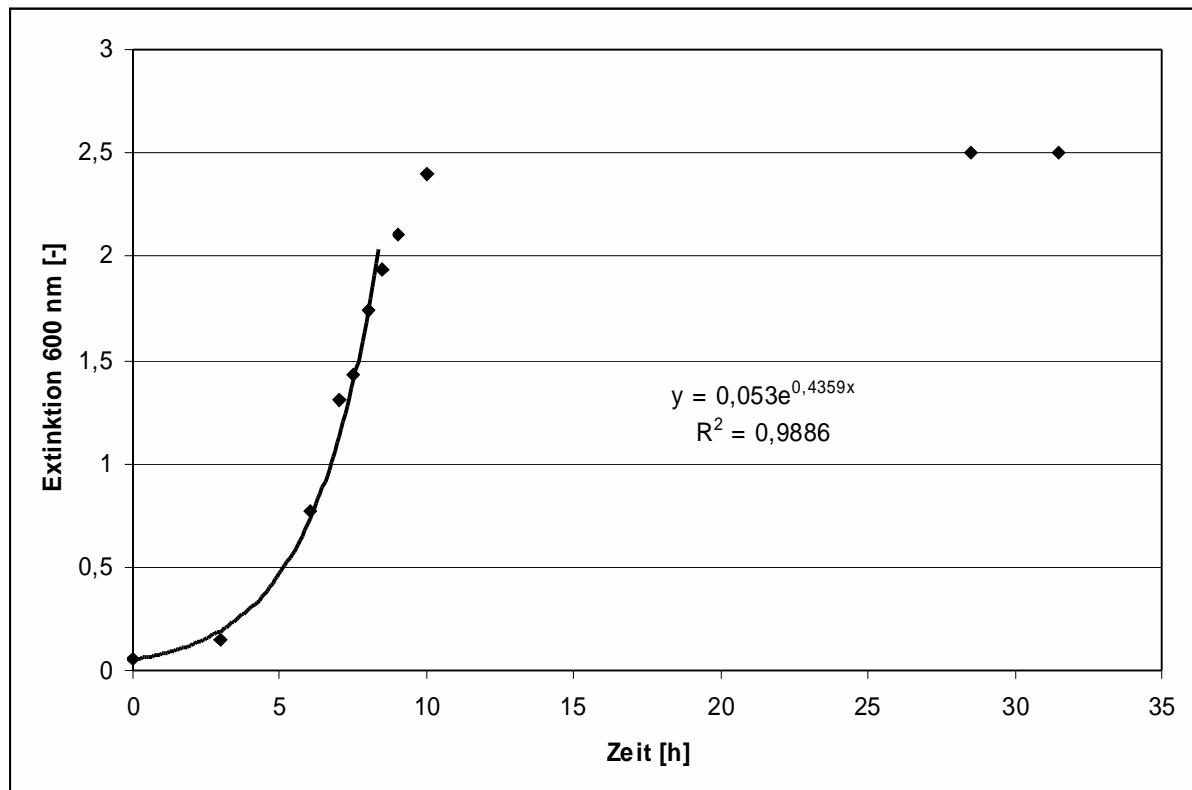
Die Korrelation von optischer Dichte und Biotrockenmasse wurde mittels Geradenregression ermittelt. Dazu wurden die OD und BTM simultan im Verlauf des Wachstums im Kolben gemessen. Die OD wurde in Doppelbestimmung, die BTM in Dreifachbestimmung bestimmt (Abschnitt 4.5.7, S. 37). Für *C. glutamicum* DSM 20300 ergab sich in MM2\_2 folgende Korrelation (Abb. 23, S. 65):

$$\text{BTM}_{\text{DSM 20300}} = 0,68 * \text{Extinktion}_{600} [\text{g/l}]$$



**Abb. 23:** Korrelation zwischen der Extinktion<sub>600</sub> und der Biotrockenmasse (BTM) von *C. glutamicum* DSM 23000 in Medium MM2\_2

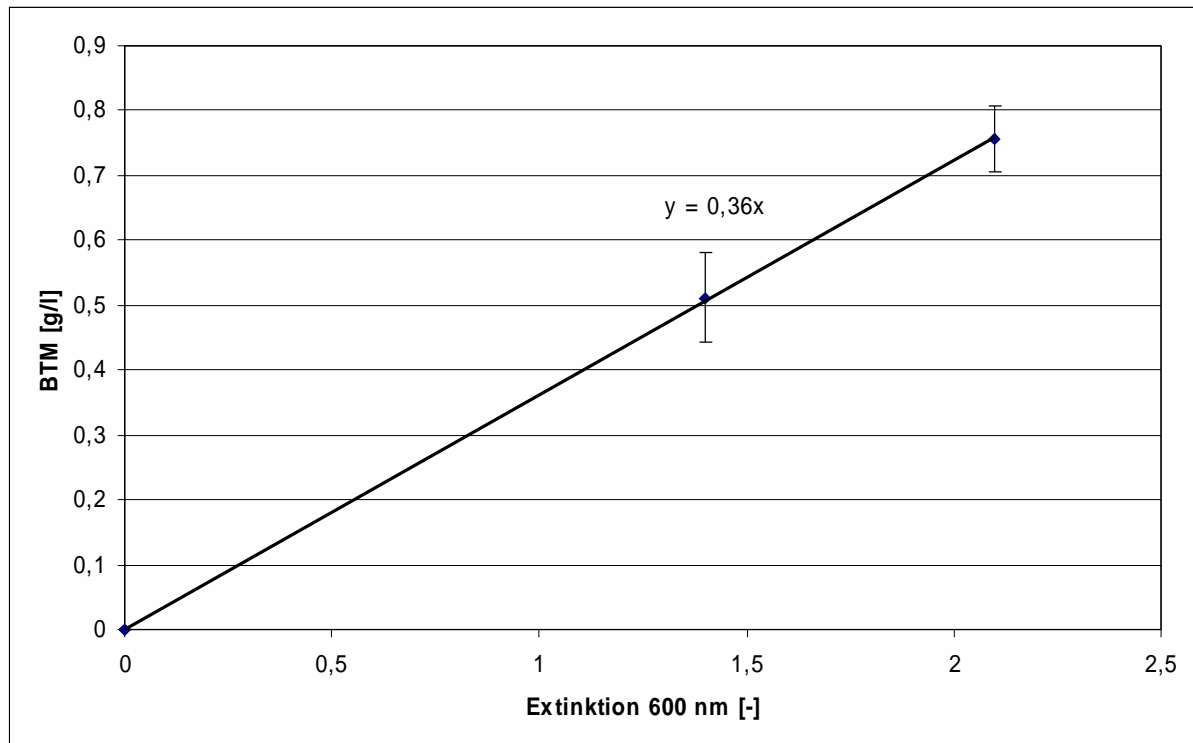
Um zu zeigen, dass das Wachstum von *C. glutamicum* DSM20300 in einem Komplexmedium (53) nicht unbedingt besser verläuft als in einem definierten an die Wachstumsansprüche angepassten Minimalmedium (MM2\_2), wurde eine Wachstumskurve in Medium 53 aufgenommen (Abb. 24, S. 66). Der exponentielle Bereich der Wachstumskurve verläuft bis etwa Extinktion<sub>600</sub> 2,0. Die Verdopplungszeit von DSM 20300 Wildtyp in Medium 53 beträgt 97 min.



**Abb. 24:** Wachstumskurve von *C. glutamicum* DSM 20300 in **Medium 53**; jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus 2 Extinktionswerten. Die Hauptkultur im Doppelansatz wurde mit 2 % einer Medium 53-Vorkultur Extinktion<sub>600</sub> von 0,8 inokuliert. Die Inkubation erfolgte in 100 ml Schikanekolben mit einer Befüllung von 20 ml bei 30 °C und 150 rpm.

Die BTM von DSM 20300 Wildtyp in Medium 53 wurde stichprobenartig im Verlauf der Wachstumskurve innerhalb der exponentiellen Phase bei einer Extinktion<sub>600</sub> von 1,4 und 2,1 im 3fach-Ansatz bestimmt. Für *C. glutamicum* DSM 20300 ergab sich in Medium 53 folgende Korrelation (Abb. 25, S. 67):

$$\text{BTM}_{\text{DSM 20300}} = 0,36 * \text{Extinktion}_{600} [\text{g/l}]$$



**Abb. 25:** Korrelation zwischen der Extinktion<sub>600</sub> und der Biotrockenmasse (BTM) von *C. glutamicum* DSM 23000 in Medium 53

Daraus ergibt sich, dass die Wachstumsgeschwindigkeit von DSM 20300 in MM2\_2 ca. 1,2x so hoch wie in Medium 53 ist; es werden in MM2\_2 deutlich höhere Extinktionen und Biotrockenmassewerte erreicht. Der Faktor, der den Zusammenhang zwischen Extinktion und BTM beschreibt, ist in MM2\_2 fast doppelt so hoch wie in Medium 53. Damit scheint MM2\_2 die Voraussetzungen für eine gutes Screening- und Fermentationsmedium für die Suche nach Methionin-überproduzierenden Mutanten zu erfüllen.

### 5.1.3.c MM2\_2

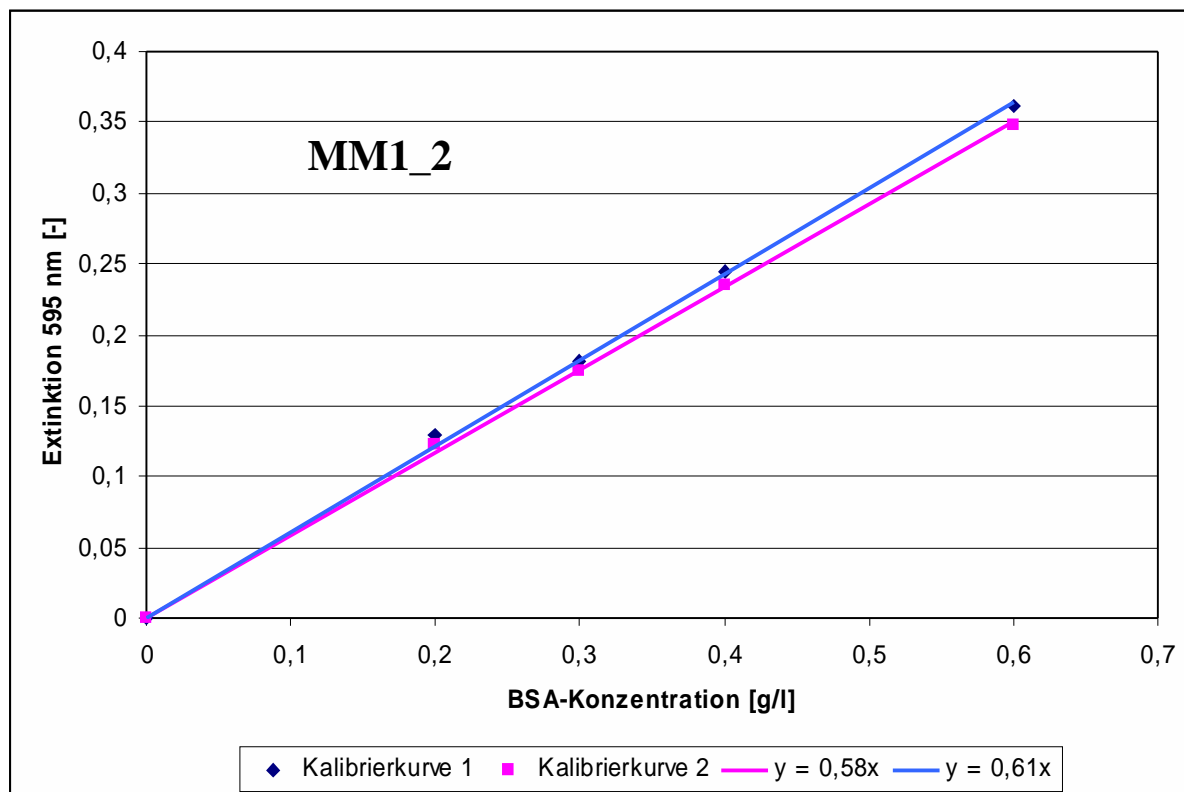
Der einzige Unterschied von MM2\_2 zu MM2 besteht in der Dosierung und Form der Schwefelgabe. In MM2\_2 wird das Ammoniumsulfat auf 5 g/l reduziert und kein Thiosulfat zugegeben, da die hohen Salzkonzentrationen zu erheblichen Schwierigkeiten im Bereich der GC-Analytik führten, indem die vorhergehende Derivatisierung gestört wurde. Das Wachstumsverhalten von *C. glutamicum* DSM 20300 ist in MM2\_2 genauso gut wie in MM2.

#### **5.1.4 Optimale Wachstumsparameter für *C. glutamicum* DSM 20300 im Reagenzglas und Kolben bei Einsatz von Medium MM2\_2**

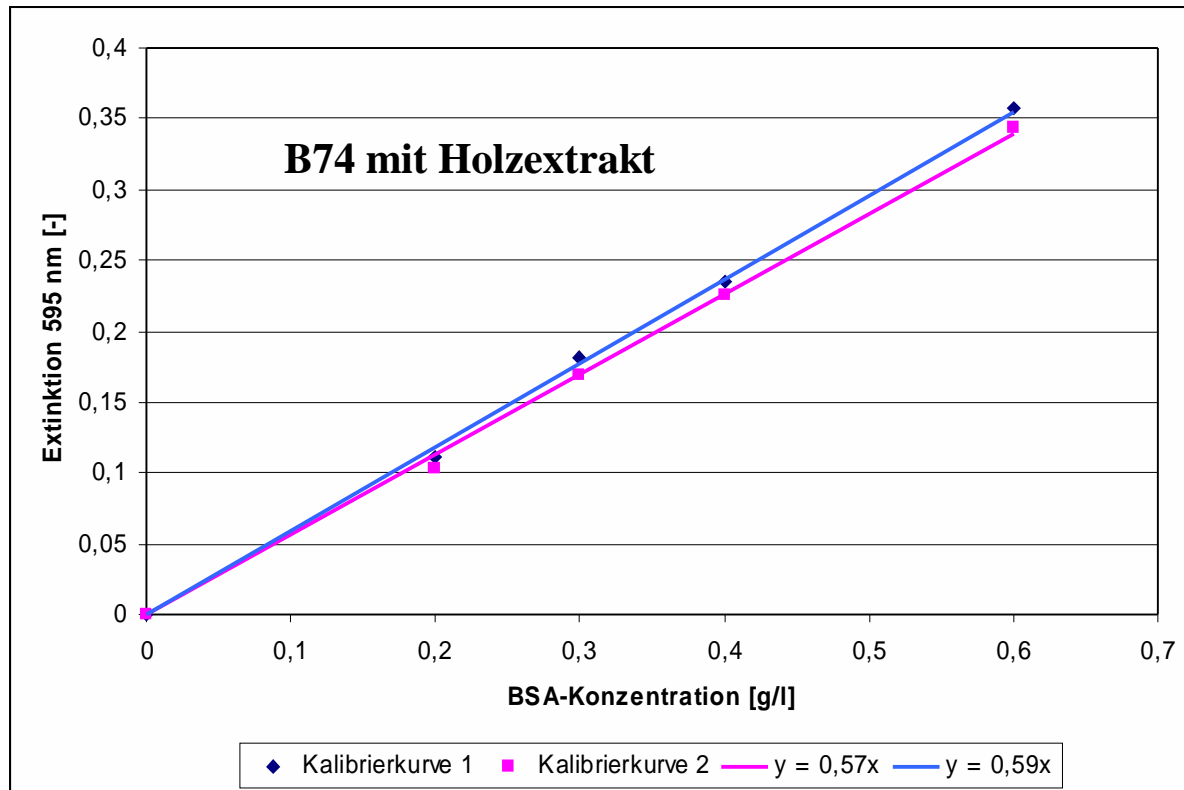
Aufgrund der starken Abhängigkeit des Wachstums vom Sauerstoffeintrag erscheint eine Anwendung von Reagenzgläsern für *C. glutamicum* nicht sinnvoll, da der Eintrag von Sauerstoff über Rührkerndrehung oder schräge Schüttelinkubation nicht ausreicht für Extinktionen<sub>600</sub> von größer als 3,0. 100 ml Schüttelkolben mit 2 Schikanen erwiesen sich bei einer Temperatur von 30-32 °C, einer Schüttelfrequenz von 180 rpm (25 mm Rund-Schüttelbewegung) und einer Inkubationsdauer von 16-24 h als optimal, um Wachstumskurven mit End-Extinktionen<sub>600</sub> von 8-9 gegen Ende der exponentiellen Phase zu erzielen (Abb. 22, S. 63). Die Miniaturisierung der Schüttelinkubation geht in Richtung einer 96 well Platten Inkubation (siehe Abschnitt 5.3.2.b, S. 122ff.).

#### **5.1.5 Proteingehalt in *C. glutamicum* DSM 20300 in Abhängigkeit vom Medium**

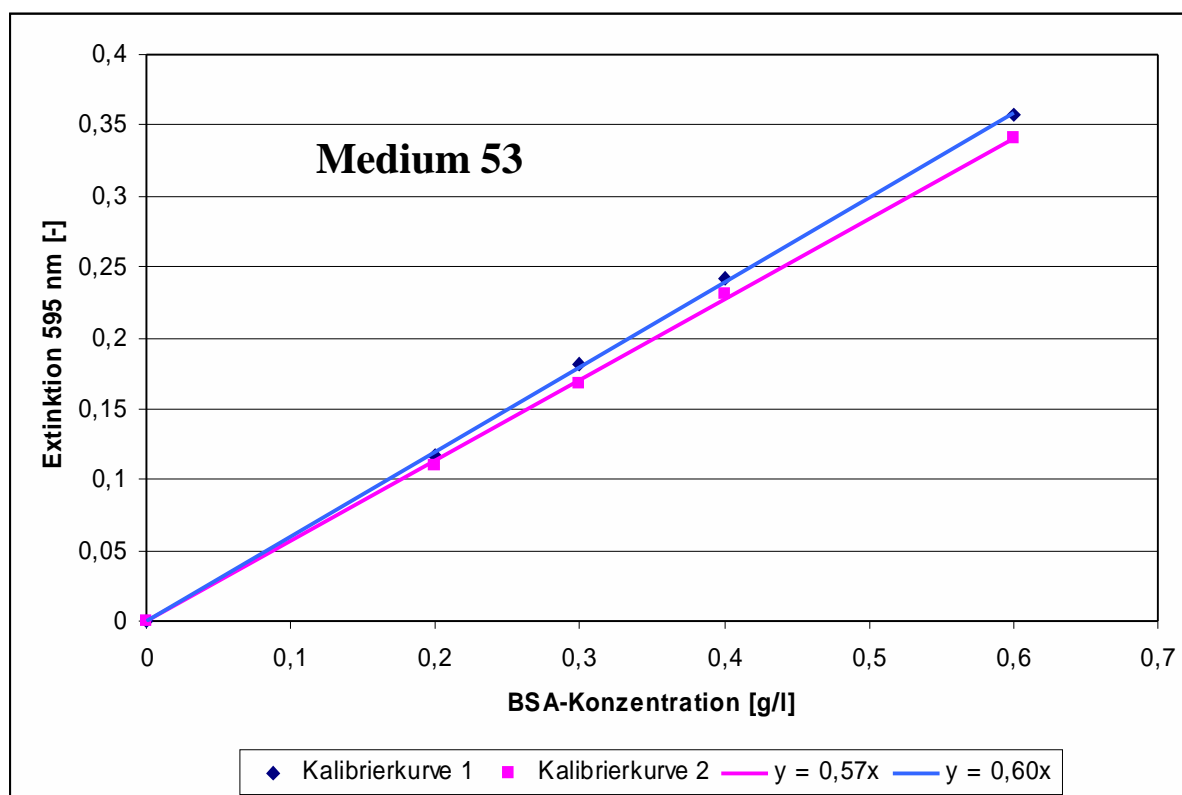
Der Proteingehalt der Zellen von *C. glutamicum* DSM 20300 variiert je nach Wachstumsmedium, in welchem die Kultivierung erfolgte (Tab. 7, S. 70; Abb. 29, S. 71). Zum einen gibt es die Strukturproteine, die auf jeden Fall für das Überleben der Zelle notwendig sind, zum anderen die Enzyme, die je nach Nahrungsangebot und davon abhängigem An- oder Ausschalten bestimmter Stoffwechselwege vorliegen oder nicht. Es war zu erwarten, dass vor allem beim Vergleich des Gehalts an löslichen Proteinen Unterschiede zwischen komplexen und minimalen Medien zu erkennen sind. Zellen, die in einem Minimalmedium gewachsen sind, haben sehr wahrscheinlich weniger Stoffwechselwege angeschaltet als Zellen aus einem komplexen Medium und dementsprechend auch weniger Enzyme (lösliches Protein). Alle Kalibrierkurven der folgenden Versuche zur Bradford-Proteinbestimmung wurden bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Perkin-Elmer Photometer aufgenommen (Abb. 26-28, S. 69, 70). Eine MM1\_2-Vorkultur mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 1 wurde hergestellt. Die Hauptkulturen in den drei Medien 53, B74 mit Holz und MM1\_2 wurden mit 8 % dieser Vorkultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 30 °C und 150 rpm bei einer 20 ml Befüllung in 100 ml Kolben ohne Schikane; die zu vermessenden Proben wurden für 5 min bei 4500 g zentrifugiert; der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in Lysispuffer resuspendiert. Im Lysispuffer wurde eine Extinktion<sub>600</sub> von 3,0 eingestellt. Der Ultraschall-Aufschluss wurde in einem Volumen von 5 ml in 13 ml Röhren (Sarstedt) für 5x 1 min bzw. 10x 1 min durchgeführt.



**Abb. 26:** Kalibrierkurven 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung in **MM1\_2**



**Abb. 27:** Kalibrierkurve 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung in **B74 mit Holzextrakt**



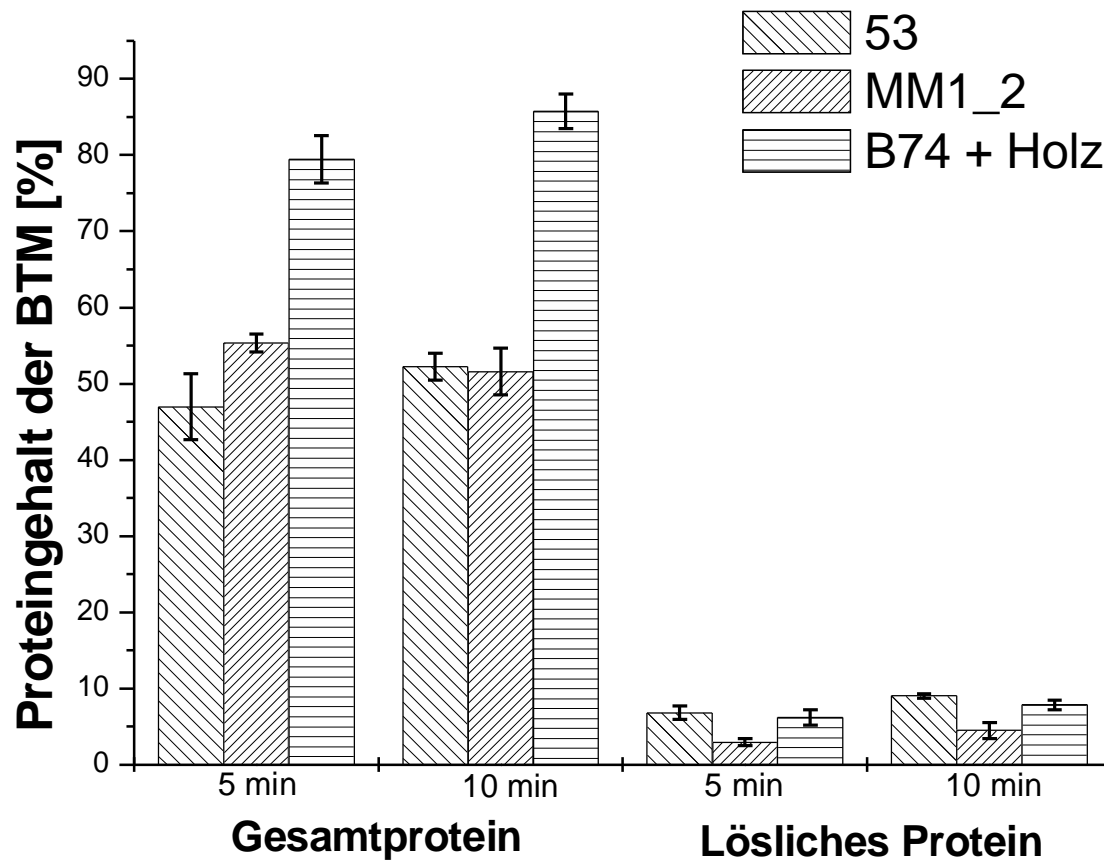
**Abb. 28:** Kalibrierkurve 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung in **Medium 53**

**Tab. 7:** Proteingehalt der BTM [%] in Abhängigkeit vom Kulturmedium und der Ultraschall-Aufschlusszeit

Medium 53		Medium 53		MM1_2		MM1_2		B74		B74	
gesamt		löslich		gesamt		löslich		gesamt		löslich	
5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min	5 min	10 min
48,17	52,42	5,70	9,05	54,61	47,54	2,54	3,62	76,06	83,82	4,81	7,02
52,43	54,60	7,42	9,41	55,42	51,61	3,08	3,62	81,42	88,07	6,93	7,76
42,64	50,43	6,61	8,78	56,96	52,25	2,62	5,70	77,63	83,73	6,84	8,50
44,64	51,52	7,51	8,87	54,33	54,96	3,53	5,07	82,62	87,42	6,19	8,13

Die Erwartungen zum Versuchsverlauf konnten mit Tab. 7 (S. 79) und Abb. 29 (S. 71) bestätigt werden. Im komplexen Medium 53 haben die Zellen nach 10 min Aufschlusszeit mit ca. 9 % den höchsten Gehalt an löslichem Protein; knapp darunter befinden sich mit ca. 8 % die Zellen, die in B74 bei Zusatz von Holzextrakt gewachsen sind. Der Wert würde ohne Zusatz von Holz sehr viel geringer liegen (Daten nicht gezeigt). Zellen aus MM1\_2 Medium haben mit ca. 4,5 % den geringsten Anteil an löslichem Protein. Der Gesamtproteinanteil in

Zellen aus B74 mit Holzzusatz ist mit Abstand am höchsten; dies dürfte durch das Holz und nicht durch Protein aus den Zellen erklärbar sein. In MM1\_2 und Medium 53 ist der Gesamtproteingehalt der Zellen sehr ähnlich (50-55 % der BTM) und unterscheidet sich nach 5 und 10 min Aufschlusszeit nur wenig.



**Abb. 29:** Proteingehalt der BTM [%] in *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp in Abhängigkeit vom Kulturmedium und der Ultraschall-Aufschlusszeit (5x 1 min und 10x 1 min); 1 Balken wurde aus jeweils 4 Werten gemittelt (4fach Ansätze); die aufzuschließenden Proben wurden alle auf eine Extinktion<sub>600</sub> von 3,0 in Lysispuffer eingestellt. Extinktion<sub>600</sub> 3,0 = ca. 1 g/l BTM

Bei der Betrachtung des löslichen Proteins in Abb. 29 (S. 71) fällt auf, dass die Werte mit Zunahme der Aufschlusszeit noch etwas steigen. Das bedeutet, dass 10 min noch nicht das Aufschlussoptimum waren. Da es sich bei diesem Versuchsteil um eine qualitative Betrachtung des Zellinneren handelte, wurde von einer Optimierung der Zellaufschluss-Methodik abgesehen.

### **5.1.6 Bestimmung des Methionin-Gehalts in *C. glutamicum* DSM 20300 in Abhängigkeit vom eingesetzten Minimalmedium**

Der Zellaufschluss sollte in qualitativer Art Aufschluss darüber geben, ob im Zellinneren des Wildtyps DSM 20300 deutlich mehr Methionin vorliegt als im zellfreien Überstand (ausgeschleustes Methionin). Es wurde der intra- und extrazelluläre Methionin-Gehalt in Medium MM1\_2 und B74 bestimmt. Die bei einer Extinktion<sub>600</sub> von jeweils 1,0 gemessene extrazelluläre Methionin-Konzentration betrug in beiden Medien 1 mg/l (= 0,31 % der BTM). Bei 5 min Ultraschall-Aufschluss in Medium MM1\_2 und B74 ergaben sich 0,05 % und bei 10 minütigem Aufschluss ein intrazellulärer Methionin-Gehalt von ca. 0,1 % der BTM. Da nicht geprüft wurde, ob ein 100 %iger Aufschluss erzielt wurde, könnten die Werte für intrazelluläres Methionin in Wirklichkeit noch etwas höher liegen. Beim Lysozymaufschluss wurde in beiden Medien eine Methionin-Konzentration von etwa 0,2 % der BTM ermittelt. In der Diplomarbeit von D. Deutenberg wurde eine zellinterne Methionin-Konzentration von 70,0 mg/l bei DSM 20300 festgestellt (Deutenberg, D., 2003).

In dieser Arbeit wurde die folgende BTM-OD-Korrelation zugrunde gelegt:

$$\text{BTM}_{\text{DSM 20300}} = 0,33 * \text{Extinktion}_{600} [\text{g/l}]$$

Es konnte festgestellt werden, dass sich intra- und extrazellulärer Methionin-Gehalt beim Wildtyp nicht sehr voneinander unterscheiden. Da für einen effizienten Methionin-Produzenten die Sekretion des produzierten L-Methionins in den Kulturüberstand sinnvoll erscheint, wurde auf weitere Bestimmungen der intrazellulären Methionin-Konzentration verzichtet. Diese Methode kann lediglich als Anhaltspunkt für die Optimierung eines Stammes durch Mutation oder für die Medienoptimierung dienen. Die Menge an L-Methionin im Kulturüberstand ist wesentlich bedeutsamer und wird per Gaschromatographie genauestens untersucht. Da der Wildtyp von DSM 20300 deutlich weniger als 10 mg/l Methionin bildet, muss die Methionin-Analytik darauf abgestimmt in dem Konzentrationsbereich 1-10 mg/l zuverlässig arbeiten.



## **5.2 Methionin-Analoga und ihre Eignung für ein Screening nach Methionin-Überproduzenten**

Laut Literatur eignen sich Methionin-Analoga (MA) für ein Screening nach Methionin-Überproduzenten (siehe Abschnitt 3.4 (Gomes, J. and Kumar, D., 2005; Kumar, D. et al., 2003; Kumar, D. and Gomes, J., 2005)). Die Methoden zur Bestimmung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (MIK) und der Selektion MA-resistenter Mutanten wurden bereits in Abschnitt 4.5.13 auf S. 49ff. erläutert.

### **5.2.1 Bestimmung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration**

Es musste eine Methode gefunden werden (Abschnitt 4.5.13.a, S. 51ff.), mit der es möglich ist, MA-resistente von nicht resistenten Stämmen unterscheiden zu können. Für die Etablierung einer solchen Methode wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Medienzusammensetzung
- Arbeiten in Flüssigkultur oder auf Agarplatten
- Reproduzierbare Animpftechnik
- Inkubationsbedingungen (Temperatur, Zeit)

Da komplexe Medien Aminosäuren enthalten, die den Effekt der MA stören könnten, erscheint es sinnvoller, in einem Minimalmedium zu arbeiten. In Flüssigkultur kann über die Trübung in einem MA-haltigen Medium eine Resistenz festgestellt werden, auf Agarplatten über das Wachstum von Einzelkolonien (EK). Wie aber unterscheidet man die Trübung von Suspensionen bei verschiedenen MA-Konzentrationen, wenn es sich nicht um einen proportionalen Zusammenhang handelt? Eine Feststellung, ob die Suspension bewachsen oder unbewachsen ist, reicht für die Definition der MIK nicht aus. Es war ein Maß erforderlich, um den Grad des Wachstums bei verschiedenen MA-Konzentrationen zu bestimmen. Da sich in einer trüben (MA-resistenten) Suspension außerdem auch eine Minderheit nicht resistenter Zellen befinden könnte, müsste sich eine Vereinzelung der tatsächlich resistenten Zellen anschließen. Der Vorteil an EK auf Agarplatten lag in der besseren Auszählbarkeit. Um *C. glutamicum* DSM 20300 EK auf Medium 53-Platte herzustellen (Durchmesser ca. 1 mm), wurde mit einer Impföse eine ca. 1 cm lange und ca. 2-3 mm breite Spur Zellmasse von 53er Arbeitsplatte DSM 20300 abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 0,9 % iger

NaCl-Lösung überführt. Nach Resuspendierung wurde eine Verdünnungsreihe bis  $10^{-4}$  hergestellt. Von der  $10^{-3}$  Verdünnung wurden 5 µl, von der  $10^{-4}$  Verdünnung 10 µl auf eine neue 53er Platten übertragen und mittels Drigalski-Spatel ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 30 °C mit anschließender Inkubation für 24 h bei 20 °C. Nach dieser Prozedur hatten die EK eine reproduzierbar konstante Größe von 1 mm im Durchmesser. Die gewonnenen EK von DSM 20300 sind die Grundlage für den Plattentest zur Bestimmung der MIK jedes eingesetzten Analogons (Tab. 4, 4.5.13). Die Literatur zum Thema MIK bei MA (Kase, H. and Nakayama, K., 1975a; Kumar, D. et al., 2003; Mondal, S. et al., 1994b; Mondal, S. et al., 1994a; Mondal, S. and Chatterjee, S.P., 1994; Sharma, S., 2001; Yamada, H. et al., 1982) lässt den Schluss zu, dass MA ab einer bestimmten Konzentration in der Lage sind, die Zellen von *C. glutamicum* abzutöten. In den zu Beginn der Untersuchung in dieser Arbeit durchgeführten Tests zur Hemmwirkung von MA wurde Zellmasse des Wildtyps DSM 20300 mit 3-Ösen-Ausstrich auf MA-Platten aufgebracht. Es konnte festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen Animpfmenge und Hemmwirkung besteht. Wurde mit großem Zellvolumen angeimpft, so wuchs auch bei höchsten MA-Konzentrationen eine Population an resistenten Zellen heran. Keine der untersuchten MA-Konzentrationen zeigte abtötende Wirkung, es handelte sich immer um eine Hemmwirkung, die durch langsamer wachsende Zellen gekennzeichnet war, nicht aber das Wachstums komplett hemmte. Die gleiche Form der Abhängigkeit konnte zwischen der Inkubationstemperatur, der Inkubationsdauer und dem Wachstum der Wildtyp-Zellen auf Agarplatten mit verschiedenen MA-Konzentrationen festgestellt werden. Bei 30 °C (oder wärmer) und einer Inkubationsdauer, die 24 h übertraf (z.B. 48 oder 72 h), wuchsen immer Wildtyp-Zellen, ganz unabhängig davon, wie hoch die eingesetzte MA-Konzentration war. Es konnte festgestellt werden, dass die Hemmwirkung erst dann einsetzte, wenn die untersuchten Zellen an Methionin ausgehungert waren. Zellen, deren Stoffwechsel mit allen lebensnotwendigen Nährstoffen aus Medium 53 versorgt waren, wurden auf die 1. MA-Platte gepickt und für 24 h bei 20 °C an Methionin ausgehungert. Ein Restwachstum könnte trotz hoher MA-Konzentration zu der Fehlinterpretation einer MA-Resistenz verleiten. Aber ein erneutes Picken der EK von der 1. MA-Platte auf eine 2. MA-Platte mit einer Inkubation von weiteren 24 h – 48 h bei 20 °C konnte erstmalig die Hemmwirkung deutlich zeigen. Nicht resistente Zellen wuchsen langsamer und gelangten im Vergleich zum Wildtyp auf 53er Platte nur zu einem dünnen, glasig wirkenden Bewuchs, der EK-Größen von < 1 mm hervorbrachte. Eine Unterscheidung resistenter von nicht resistenten EK war nur über die EK-Größe und die

Beschaffenheit (Qualität) des Bewuchses möglich, nicht aber über eine eindeutige Ja/Nein-Entscheidung zur MA-Resistenz. Es wurde eine Codierung für sehr gutes (++), gutes (+) mittleres bis schlechtes (+/-) und kein Wachstum (-) entworfen. Als Positiv-Kontrolle diente stets die EK-Größe und Qualität des Wildtyps auf 53er Platte (1 mm Durchmesser). Zusammenfassend war die Hemmwirkung der MA von folgenden Faktoren abhängig:

- Animpfmenge
- Inkubationstemperatur
- Inkubationsdauer
- Konzentration der eingesetzten MA
- Aushungern der Zellen nach Methionin

**Tab. 8:** Übersicht über die mit verschiedenen MA durchgeführten Pickversuche zur Bestimmung der MIK für *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp

Methionin-Analogon	getestete Konzentrationen [g/l]	MIK [g/l]
DL-Ethionin	2,0; 5,0; 8,0	5
L-Ethionin	0,9	keine Hemmung
DL-Norleucin	0,2; 1,0; 3,0; 5,0; 8,0; 12,0	5,0 -8,0
L-Norleucin	0,9	keine Hemmung
DL-Methioninsulfoxid	2,0; 4,0; 6,0; 12,0	keine Hemmung
DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid	5,0; 10,0; 15,0	keine Hemmung
N-Acetyl-DL-Methionin	5,0; 10,0	keine Hemmung
1,2,4-Triazol	3,0; 6,0; 12,0	6,0
2fach-Kombination DL-Ethionin/DL-Norleucin	5,0; 5,0	5,0; 5,0
3fach-Kombination DL-Ethionin/DL-Norleucin/1,2,4-Triazol Variante A	5,0; 5,0; 3,0	5,0; 5,0; 3,0 gleiche Hemmwirkung wie 2fach Kombination
3fach-Kombination DL-Ethionin/DL-Norleucin/1,2,4-Triazol Variante B	5,0; 5,0; 6,0	5,0; 5,0; 6,0 beste Hemmwirkung

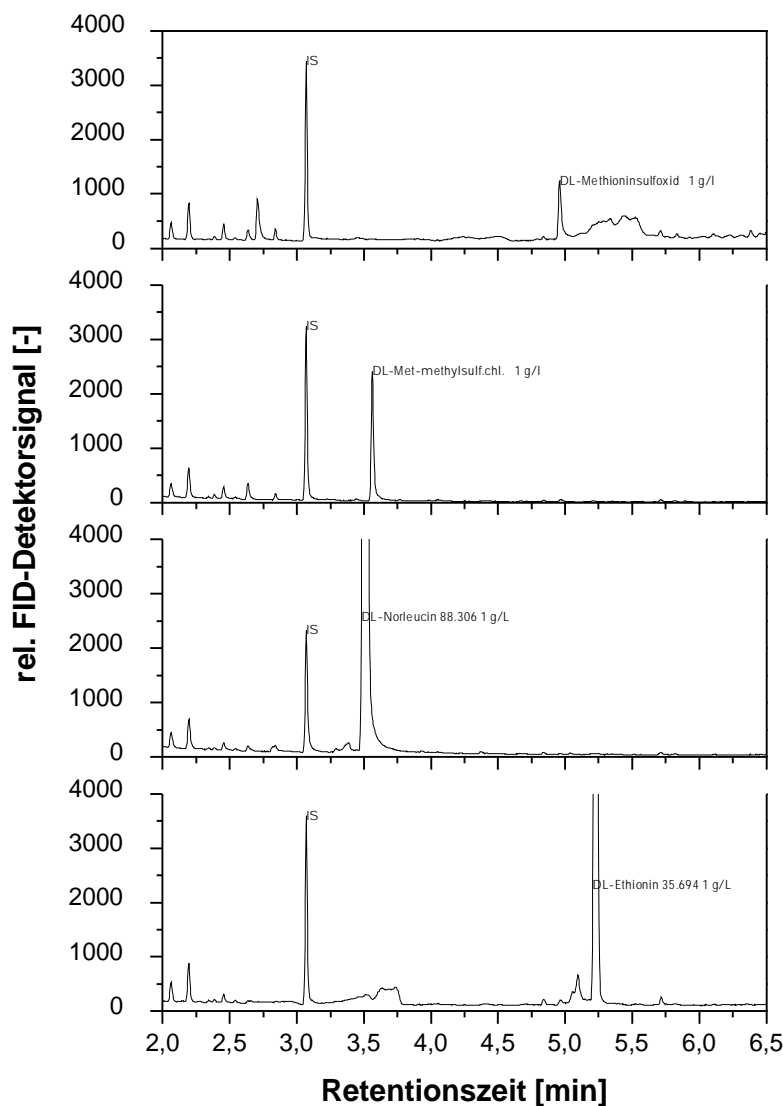
Anhand der Tabelle 8 (S. 75) ist zu erkennen, dass die Hemmwirkung erst bei sehr hohen Konzentrationen von DL-Ethionin, DL-Norleucin und 1,2,4-Triazol einsetzte. Die anderen getesteten MA zeigten gar keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten des Wildtyps. Obwohl 8 g/l DL-Ethionin stärker hemmten als 5 g/l - das Gleiche galt für DL-Norleucin - wurden in der 3fach Kombi-Platte (5; 5; 6) die etwas geringeren Konzentrationen eingesetzt, die einen Kompromiss zwischen ausreichender Hemmwirkung, Einschränkung der Gefährlichkeit beim Umgang und der Entsorgung der Substanzen und einer geeigneten Kosten-Nutzen-Relation darstellten. Die 2fach Kombi-Platte mit je 5 g/l DL-Ethionin und DL-Norleucin zeigte eine leicht verbesserte Hemmwirkung als DL-Ethionin und DL-Norleucin für sich allein betrachtet. Die Hemmwirkung konnte noch gesteigert werden durch 3fach Kombination mit dem Analogon 1,2,4-Triazol. Triazol zeigte sowohl im Einzelversuch als auch im Kombi-Versuch die beste und stärkste Hemmwirkung. Triazol war die einzige Substanz unter den untersuchten MA, die schon beim ersten Picken auf MA-Platte ab einer Konzentration von 6 g/l fast vollständige Hemmwirkung zeigte, d.h. ohne vorheriges Aushungern an Methionin.

### **5.2.2 Hitzestabilität der eingesetzten Methionin-Analoga**

Da die eingesetzten MA nicht die in der Literatur beschriebene Hemmwirkung bei wesentlich geringeren Konzentrationen erzielten, lag bei kritischer Betrachtung des Problems der Verdacht nahe, dass die MA evtl. durch Einwirkung von Hitze (60-70 °C) bei der Vereinigung mit dem flüssigen B74-Agar ihre Wirksamkeit durch Zerfall verloren. Es wurden Versuche zur Hitzestabilität der eingesetzten MA durchgeführt, bei der die Proben vor und nach Hitzeeinwirkung mit dem EZ:faast-Kit (Phenomenex, Aschaffenburg) derivatisiert und mit dem GC vermessen wurden (Tab. 9, S. 78; Abb. 30, S. 77). Standards von je 1 g/l Analogon in Wasser wurden untersucht. Es wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- MA verhalten sich bei Derivatisierung ähnlich wie Methionin. Wenn ein MA über –NH<sub>2</sub>- und –COOH-Gruppe verfügt, ist es wahrscheinlich, dass diese Substanz mit dem EZ:faast-Kit derivatisierbar ist.
- Wenn das bei Raumtemperatur aufbewahrte entsprechende MA im Chromatogramm einen eindeutig zuzuordnenden Peak ergibt und dieser an gleicher Stelle mit ähnlicher Höhe nach Einwirkung von Hitze vorliegt, so ist das Analogon hitzestabil (+).

- Wenn aus einem Peak nach Hitzeeinwirkung zwei oder mehr Peaks werden oder die Peaks verschwinden, kann die Wirksamkeit durch Zerfall der Substanz angezweifelt werden (-).
- Wenn vor und nach Hitzeeinwirkung kein Signal detektierbar ist, ist keine Aussage über die Hitzestabilität möglich (?).



**Abb. 30:** GC-Vermessung von 1 g/l Standards der Methionin-Analoga DL-Ethionin, DL-Norleucin, DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid und DL-Methioninsulfoxid in Wasser; beispielhaft dargestellt sind die Standards, die für 24 h einer Temperatur von 60 °C ausgesetzt waren; eingesetzte GC-Methode mit folgenden Unterschieden zu der in 4.5.10.a beschriebenen Methode: Temperaturprogramm Start bei 110 °C; Rate von 20 °C/min bis auf 250 °C; Rate von 10 °C/min bis auf 330 °C; Gesamtzeit 14,0 min; konstanter Druck bei 24 kPa, Split 1:15, Gesamtfluss 24 ml/min; Gesamtzeit 14,0 min. IS = Interner Standard Norvalin; DL-Met-methylsulf.chl. = DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid

**Tab. 9:** Untersuchungen zur Hitzestabilität der in dieser Arbeit eingesetzten MA: + = hitzestabil; - = nicht hitzestabil; +/- = evtl. hitzestabil; ? = keine Aussage über Hitzestabilität möglich

<b>Methionin-Analogon</b>	<b>24 h Raumtemperatur<sub>1</sub></b>	<b>24 h 60 °C</b>	<b>1 h 105 °C</b>
DL-Ethionin	+	+	+
DL-Norleucin	+	+	+
DL-Methioninsulfoxid	+/-	+/-	+/-
DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid	+/-	+/-	+/-
1,2,4-Triazol	?	?	?

<sub>1</sub> Raumtemperatur betrug im vorliegenden Fall 22 °C

Da die detektierten Peaks für die untersuchten MA in den drei verschiedenen Temperaturversuchen identisch waren, wurden in Abb. 30 auf S. 77 beispielhaft nur die Chromatogramme für den 60 °C Versuch dargestellt. Im vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass 1,2,4-Triazol vor und nach Hitzeeinwirkung nicht per GC detektierbar bzw. nicht mit dem EZ:faast-Kit derivatisierbar ist; Aussagen zur Hitzestabilität waren so nicht möglich. Der Interne Standard Norvalin (IS) hatte eine Retentionszeit von 3,07 min, DL-Norleucin lag mit 3,52 min nahe der Retentionszeit von DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid (3,56 min). DL-Ethionin lag mit der Retentionszeit 5,23 min nahe DL-Methioninsulfoxid (4,96 min). DL-Norleucin und DL-Ethionin zeigen besonders gut zu detektierende große Peaks bei einer Standard-Konzentration von 1 g/l in Wasser. Da beide Peaks in Abb. 30 (S. 77) oben abgeschnitten sind, wurde die maximale Peakhöhe des relativen FID-Detektorsignals (nicht kalibriert) neben den Peaks vermerkt. DL-Norleucin schien in der Derivatisierung Einfluss auf die Konzentration des Internen Standards zu nehmen (beim Beladen des Ionenaustauschertips; siehe Abschnitt 4.5.10.b, S. 43ff.), da in den drei Versuchsansätzen (Raumtemperatur, 60 °C und 105 °C) extrem unterschiedliche IS-Peak-Höhen erreicht wurden (Daten nicht gezeigt), was letztendlich auch zu einer Schwankung der DL-Norleucin-Peak-Höhe bei gleichbleibender Retentionszeit führte. Bei den MA DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid und DL-Methioninsulfoxid war kein negativer Einfluss auf die Qualität und Höhe des IS-Peaks nach Derivatisierung zu verzeichnen. Trotzdem waren beide Peaks im Verhältnis zu DL-Norleucin und DL-Ethionin extrem niedrig, aber reproduzierbar. Eine Besonderheit ergab sich bei näherer Betrachtung des Chromatogramms von DL-Methioninsulfoxid; der dieser Substanz zuzuordnende Peak lag

direkt vor einer breiten Schulter im Chromatogramm. Die Schulter erstreckt sich vom Ende des DL-Methioninsulfoxid-Peaks bis ca. 5,6 min. Sowohl der Peak selbst als auch die Schulter sind bei mehrmaliger Wiederholung des Versuchs reproduziert worden. Da bei allen in diesem Versuch getesteten MA eine Konzentration von 1 g/l in Wasser vorlag, war zu erwarten, dass alle zu detektierenden Substanzen eine ähnliche Peakhöhe im Chromatogramm aufweisen würden. DL-Methioninsulfoxid und DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid zeigten aber unverhältnismäßig kleine Peaks gegenüber DL-Norleucin und DL-Ethionin. Es könnte sich also bei den Peaks auch um Verunreinigungen handeln, die Hauptschulter wäre dann letztendlich nicht derivatisierbar bzw. per GC detektierbar. Die Annahme der mangelnden Hitzestabilität der eingesetzten MA hat sich in den durchgeführten Versuchen für DL-Norleucin und DL-Ethionin nicht bestätigen können; über Triazol konnte keine Aussage getroffen werden, auch für die beiden MA DL-Methioninsulfoxid und DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid konnte mit der hier angewandten Methode nicht eindeutig bestimmt werden, ob eine Hitzestabilität vorliegt oder nicht. Es ist weiterhin unklar geblieben, warum in der Literatur andere MIK für gleiche MA beschrieben wurden, selbst wenn diese Substanzen von der gleichen Firma geordert wurden (z.B. Sigma) wie in dieser Arbeit. Weitere Untersuchungen zur Hitzestabilität, z.B. per HPLC, wurden aus Zeitgründen unterlassen.

### 5.2.3 Einfluss von Methionin auf die Hemmwirkung der eingesetzten Methionin-Analoga

Es wurde untersucht, ob ein Methionin-Überschuss im Medium die Hemmwirkung von DL-Ethionin bzw. die Hemmwirkung der 3fach Kombi-Platte mit DL-Ethionin, DL-Norleucin und 1,2,4-Triazol (5; 5; 6) beeinflussen kann (Tab. 10, S. 79).

**Tab. 10:** Untersuchung des Einflusses von Methionin auf die Hemmwirkung von DL-Ethionin bzw. der Kombination von DL-Ethionin mit DL-Norleucin und 1,2,4-Triazol; 20 EK des Wildtyps von *C. glutamicum* DSM 20300 wurden auf verschiedene B74-Platten mit Zusätzen gepickt und mit der Masterplatte des Wildtyps auf Medium 53-Platte verglichen. + steht für gutes Wachstum, +/- für schlechtes Wachstum (glasig, dünn), - für kein Wachstum

Methionin-Analogon	1. MA-Platte 24 h 20 °C	2. MA-Platte 24 h 20 °C
5 g/l DL Ethionin + 2 g/l L-Methionin	20 +	20 +
5 g/l DL-Ethionin	20 +/-	14 -; 6 +/-
Dreifach-Kombi DL-Ethionin/DL-Norleucin/1,2,4-Triazol (5/5/6 g/l) + 2 g/l L-Methionin	17 +; 3 +/-	17 +; 3 +/-
Dreifach-Kombi DL-Ethionin/DL-Norleucin/1,2,4-Triazol (5/5/6 g/l)	4 -; 16 +/-	15 -; 5 +/-

Im Fall der Kombination mit nur einem MA (5 g/l DL-Ethionin) kann eine Konzentration von 2 g/l L-Methionin im Medium die Wirkung des Analogons vollständig aufheben. Bei der Dreifach-Kombi-Platte (5/5/6) ist zwar die gleiche Tendenz zu erkennen, doch reichen 2 g/l Methionin vermutlich nicht aus, um insgesamt 16 g/l verschiedene Analoga zu kompensieren. Von anfangs 20 EK wachsen auf der 2. MA-Platte mit Methionin 3 EK schlecht.

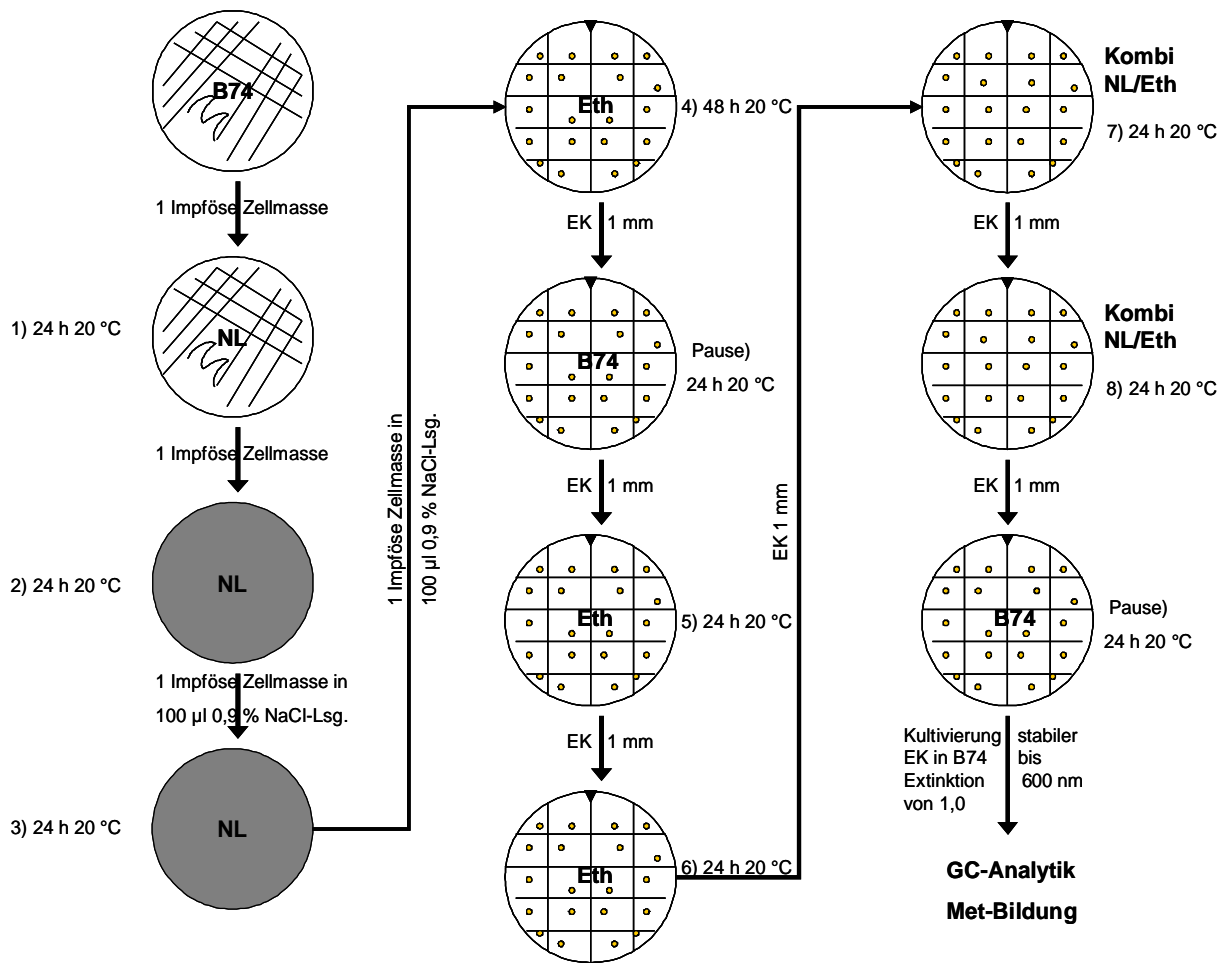


## 5.2.4 Adaptation des Wildtyps *C. glutamicum* DSM 20300 an verschiedene Konzentrationen von Methionin-Analoga

Grundlegende Idee war die Umsetzung der aus der Literatur entnommenen Information, dass *C. glutamicum* Zellen, die resistent gegen bestimmte MA sind, mehr Methionin bilden könnten; es wurde versucht, Zellen von DSM 20300 zu gewinnen, die angepasst an verschiedenen MA-Konzentrationen sind. Diese Zellen sollten dann auf ihre Met-Bildung hin untersucht werden. Im Adaptationsversuch wurde 1 Impföse Zellmasse DSM 20300 von B74-Platte (um keine komplexen Mediumbestandteile einzuschleppen) mittels 3-Ösen-Ausstrich auf eine 5 g/l DL-Norleucin-Platte (NL) ausgespatelt und 24 h bei 20 °C inkubiert. Es folgten 7 weitere Adaptationsschritte, um den Wildtyp an steigende MA-Konzentrationen zu gewöhnen und Einzelkolonien zu gewinnen, die Resistenzen gegen die MA DL-Norleucin und DL-Ethionin (Eth) aufweisen. Der Versuchsablauf ist der Tab. 11 (S. 81) zu entnehmen.

**Tab. 11:** Versuch der Adaptation des Wildtyps *C. glutamicum* DSM 20300 an verschiedene Konzentrationen der Methionin-Analoga DL-Norleucin (NL) und DL-Ethionin (Eth)

Adaptations-Schritt	Methionin-Analoga	Inkubationsdauer
1	5 g/l NL	24 h 20 °C
2	5 g/l NL	
3	5 g/l NL	
4	5 g/l Eth	48 h 20 °C
Adaptationspause	Erholung der Zellen auf B74-Platte	24 h 20 °C
5	5 g/l Eth	
6	5 g/l Eth	
7	2fach Kombi-Platte NL, Eth je 5 g/l	
8	2fach Kombi-Platte NL, Eth je 5 g/l	
Adaptationspause	Erholung der Zellen auf B74-Platte	24 h 30 °C



**Abb. 31:** Ablaufschema zur Adaptation von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp an die MA DL-Norleucin und DL-Ethionin

Das Ergebnis des ersten Schrittes auf 5 g/l DL-Norleucin-Platte war ein schwaches Wachstum nur an den Eintragsstellen (Tab. 11, S. 81; Abb. 31, S. 82). Bei Schritt 2 wurde 1 Impföse Zellmasse aus dem Bereich des Zelleintrags der Platte 1 auf eine neue Platte gleicher Norleucin-Konzentration aufgebracht und mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Es entstand nach 24 h ein flächiger Plattenbewuchs. Von Platte 2 wurde 1 Impföse Zellmasse in 100 µl einer 0,9 %igen NaCl-Lösung resuspendiert und komplett auf einer neuen Platte gleicher MA-Konzentration verteilt (Adaptationsschritt 3). Nach der Inkubation ergab sich auch hier ein flächendeckender Wuchs, von dem erneut 1 Impföse in 100 µl einer 0,9 %igen NaCl-Lösung resuspendiert und komplett auf eine neue 5 g/l DL-Ethionin-Platte aufgebracht wurde. Erst nach 48 h bei 20 °C konnte Bewuchs festgestellt werden; es wuchsen auch einige EK (Adaptation 4). 1 mm große EK aus Adaptation 4 wurden zur Erholung auf B74-Platte

gepickt und 24 h bei 20 °C inkubiert. Diese EK wurden für Schritt 5 auf 5 g/l DL-Ethionin-Platte eingesetzt. Es wurden immer die am besten gewachsenen EK auf die nächste MA-Platte gepickt (Schritt 6 – 8). Die auf der 2fach Kombi-Platte (Schritt 8) gut gewachsenen EK wurden auf B74-Platte überführt, 24 h bei 20 °C inkubiert und in flüssigem B74-Medium bei einer Extinktion<sub>600</sub> von 1 auf Methionin-Bildung getestet. Keiner der adaptierten Stämme bildet mehr Methionin als der Wildtyp, d.h. alle lagen im Bereich von etwa 1 mg/l Methionin.

### **5.2.5 Vorselektion möglicher Methionin-Überproduzenten aus einem Pool von Mutanten mittels Methionin-Analoga-Resistenz**

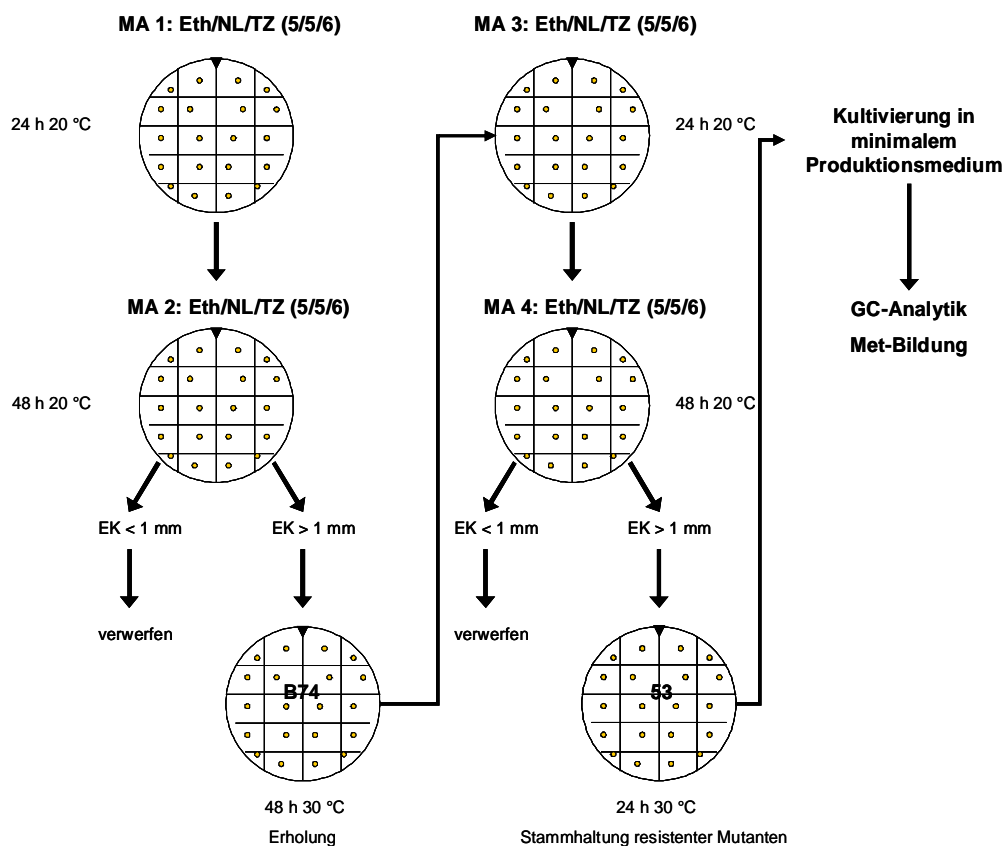
Nach Auffinden der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (Abschnitt 5.2, S. 73ff.) geeigneter Methionin-Analoga (MA) erfolgte die Anwendung auf DSM 20300-Mutanten in Form einer MA-Selektionsstrategie. Das Fazit aller durchgeführten Untersuchungen mit MA-Platten verschiedener Konzentration ist, dass eine Selektivität für MA-resistente Stämme gegenüber dem Wildtyp gegeben ist, wenn bestimmte Grundsätze bei der Selektionsmethode berücksichtigt werden:

- die Kombinationsplatte mit je 5 g/l Eth und NL zusammen mit 6 g/l 1,2,4-Triazol (TZ) ist selektiver als die einzelnen Komponenten in gleicher Konzentration
- die Selektion mit MA-Platten ist keine klare Entscheidung für Resistenz oder Nicht-Resistenz, sondern ein vom Expertenwissen des Anwenders abhängiger Vergleich der Intensität des Wachstums von Mutanten mit dem des Wildtyps auf Masterplatte
- wichtigstes Selektionskriterium ist der Durchmesser und die Bewuchsstärke der gewachsenen Kolonien nach definierten Inkubationsschritten bei bestimmter Temperatur; da der Wildtyp DSM 20300 nach 2. Picken auf Dreifach-Kombi-Platte (5/5/6) und 48 h 20 °C Inkubation nur eine EK-Größe von maximal 1 mm (meist kleiner als 1 mm und hauchdünner Bewuchs) erreicht, ist die Mindestgröße für eine positive Beurteilung von Mutanten-EK auf Resistenz 1 mm und größer
- der zwischen zwei Selektionsvorgängen durchgeführte Erholungsschritt auf B74-Platte mit anschließender erneuter Selektion auf MA-Platten stellt einen Stabilitätstest für erschaffene Mutanten dar. Dieser Schritt soll verhindern, dass instabile Mutanten,

die innerhalb weniger Generationen in den Wildtyp zurückmutieren, als resistent selektiert werden (Hintergrund: Entwicklung eines effizienten Screenings)

Eine Vorselektion der Mutanten auf MA-Resistenz könnte wie folgt aussehen (Abb.32, S.84):

- **MA 1** 24 h 20 °C auf Dreifach-Kombi-Platte (5/5/6)
- **MA 2** Picken auf Dreifach-Kombi-Platte (5/5/6), 48 h 20 °C
- **1. Beurteilung der EK:** < 1 mm Erholung auf B74-Platte 48 h 30 °C
- **MA 3** Picken auf Dreifach-Kombi-Platte (5/5/6), 24 h 20 °C
- **MA 4** Picken auf Dreifach-Kombi-Platte (5/5/6), 48 h 20 °C
- **2. Beurteilung der EK:** > 1 mm Stammhaltung resistenter EK auf Medium 53-Platte, 24 h 30 °C
- **Untersuchung resistenter EK auf Met-Bildung** in minimalem Produktionsmedium mit anschließender GC-Analytik



**Abb. 32:** Selektion von Mutanten auf MA-Resistenz mit einem Plattentest

Mit dieser Form der Selektion wurde innerhalb der Untersuchung von etwa 1000 Mutanten-EK keine einzige resistente Kolonie selektiert. Das ist eine schlechtere Ausbeute als bei der Adaptation des Wildtyps von DSM 20300 an verschiedene MA-Konzentrationen. Diese auf Literatur-Angaben basierende MA-Selektionsstrategie (Gomes, J. and Kumar, D., 2005; Sharma, S., 2001) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht verifiziert werden und wurde aus folgenden Gründen als ungeeignet verworfen:

- zu unselektiv; keine dauerhaft resistente Mutante gefunden; Wildtyp nach Adaptation resistent gegen einige MA, ohne eine Met-Überproduktion zu zeigen
- Selektionsmethode sehr zeitaufwendig
- 1,2,4-Triazol verdampft wegen seines Gasdruckes bereits bei Raumtemperatur, ist möglicherweise krebserregend und fruchtschädigend; ohne speziell eingerichtetes Labor sollte eine Arbeit mit dieser Substanz nur in Ausnahmefällen durchgeführt werden und wenn keine alternativen Vorgehensweisen zur Verfügung stehen; Gleiches gilt für Arbeiten mit Ethionin

**Tab. 12:** Übersicht über die Verfügbarkeit und Kosten der eingesetzten Methionin-Analoga

Substanz	Hersteller	Artikelnr.	Gebinde	Preis
DL- Norleucin	Fluka	74580	50 g	54,60 EUR
DL- Ethionin	Sigma	E-5139	25 g	504,00 EUR Nur mit Berechtigungsnachweis
	Alfa Aesar	A13154	25 g	148,00 EUR Nur mit Berechtigungsnachweis
L- Ethionin	Sigma	E-1260	1 g	222,00 EUR
L- Norleucin	Fluka	74560	50 g	838,00 EUR
DL- Methionin-sulfoxid	Fluka	64430	Preise nicht verfügbar (auch nicht bei anderen Vertreibern)	
DL- Methionin-methylsulfoniumchlorid	Fluka	64382	Preise nicht verfügbar (auch nicht bei anderen Vertreibern)	
1,2,4- Triazol	Fluka	90635	500 g	76,60 EUR
N- Acetyl- DL- Methionin	Sigma	A-1876	kein Vertreter	

Aus Tab. 12 (S. 85) ist zu ersehen, dass vor allem die in den 3fach-Kombi-Platten eingesetzten MA DL-Ethionin und DL-Norleucin einen hohen Kostenfaktor darstellen. Im eingesetzten Konzentrationsbereich von 5 g/l bzw. 6 g/l Analogon im Agarplattenmedium war der Verbrauch sehr hoch. Die Verfügbarkeit für DL-Ethionin konnte für einen Zeitraum von drei Jahren Forschungsarbeit nicht von den Vertriebsfirmen gewährleistet werden. Triazol dagegen ist zwar günstig aber dafür sehr giftig und teuer in der Entsorgung. Da es sich bei der MA-Selektionsstrategie lediglich um eine Vorselektion von möglicherweise Met-überproduzierenden Mutanten handelte, wurde die Strategie durch die Entwicklung eines mikrobiologischen Tests zum Met-Nachweis ersetzt. Auch in der Diplomarbeit von Deutenberg (Deutenberg, D., 2003) wird berichtet, dass eine Selektion auf Analogon-Resistenzen im Fall der Met-Überproduktion weitgehend ineffektiv war und dass die Strukturanaloga DL-Ethionin und DL-Norleucin bei *C. glutamicum* so gut wie keine Wirkung zeigten.

## **5.3 Entwicklung eines Hochdurchsatzscreenings für Methionin mit Robotereignung**

### **5.3.1 UV-Mutation von DSM 20300**

In der Evolution sind Mutationen wichtige Faktoren, damit Organismen schnell auf gegebene Umweltreize reagieren können. Je nach Art des Umwelteinflusses kann sich die spontane Mutation positiv oder negativ für den Merkmalsträger auswirken (Selektion). Die Induktion von Mutationen bei Bakterien war in der Forschung von unschätzbarem Wert, um die Wirkung von Genen zu untersuchen. Dazu gehören z.B. die Resistenzmutationen gegen Antibiotika oder die auxotrophe Mutation, bei der ein Bakterium einen bestimmten Wachstoffsstoff (z.B. eine Aminosäure) nicht selbst synthetisieren kann (Davis, B.D. and Mingioli, E.S., 1950; Lederberg, J. and Lederberg, E.M., 1952). Die kombinierten Effekte von hohen Wachstumsraten, hohen Zellkonzentrationen, Mutation und Selektion und die Fähigkeit des Genaustausches führen zu einer großen Adaptations- und Evolutionsrate bei den Bakterien. In Übereinstimmung mit den Richtlinien für die Fleischproduktion im Ökolandbau (1.3) wurde mit der UV-Mutation in dieser Arbeit eine klassische Form der Mutagenese gewählt, um *C. glutamicum* DSM 20300 ungerichtet zu einer Methionin-Überproduktion

anzuregen. Das methodische Vorgehen ist in Abschnitt 4.5.11 auf S. 45-47 erläutert. Die so gewonnenen Mutanten-Einzelkolonien (Überlebensrate etwa 0,1 %) bildeten die Basis für eine Mutanten-Kultivierung im 96 well Maßstab (Abschnitt 5.3.2.b, S123ff.) mit einem anschließenden mikrobiologischen Met-Nachweis (5.3.2.c, S. 125ff. und 5.3.3, S. 127ff.) mit Hilfe von *E. coli* B834.

### **5.3.2 Mikrobiologischer Methionin-Nachweis**

Für ein effektives Hochdurchsatz-Screening, in dem eine stetige Kosten-Nutzen-Analyse durchgeführt wird, ist es wichtig, dass die benötigten Bakterienstämme, Geräte und Materialien folgende Voraussetzungen erfüllen: Zum einen sollen die Materialien kostengünstig sein, zum anderen muss die Verfügbarkeit jederzeit gewährleistet sein. Der Stamm *E. coli* B834 ist sowohl preisgünstig, leicht zu erwerben und darüber hinaus ein gut erforschter leicht handhabbarer Mikroorganismus. Der Met-Konzentrationsbereich, in welchem *E. coli* B834 eine Abhängigkeit der Wachstumsstärke von der angebotenen Met-Konzentration zeigt, musste definiert werden. Eine Met-Sättigung durfte dabei nicht eintreten. Für den mikrobiologischen Methionin (Met)-Nachweis wurde der *E. coli*-Test anfangs im 5 ml Reagenzglas -Maßstab entwickelt. Folgende Fragestellungen wurden erarbeitet:

- reproduzierbare Herstellung eines an Met ausgehungerten *E. coli*-Inokulums
- Haltbarkeit und Lagerfähigkeit des Inokulums
- Inkubationstemperatur
- Dauer der Inkubation
- Sauerstoffeintrag über die Rührgeschwindigkeit

Die Dauer musste von anfangs 24 h auf weniger als 8 h reduziert werden. Grund war, dass *E. coli* bei längerer Inkubation in der Lage ist, Met aus den Proteinen lysierter Zellen der zu untersuchenden zellfreien Kulturüberstände von Mutanten freizusetzen, was zu falsch positiven Ergebnissen des Tests auf Met-Überproduzenten führen würde. Im Reagenzglas wurde der für das Wachstum benötigte Sauerstoffeintrag mittels Magnetrührkernen (1 cm) erreicht. Der *E. coli*-Test konnte im Reagenzglas mit folgenden Versuchsbedingungen etabliert werden: 7 h, 35 °C, 300 rpm. Der Kosten- und vor allem der Zeitfaktor (geringer Durchsatz von ca. 300 Mutanten/Monat) führten zu dem Bestreben, den *E. coli*-Test und auch

die Kultivierung der Mutanten in den automatisierbaren 96 well Maßstab von etwa 200 µl pro Reaktionsraum (well) zu überführen. Für 96 well Platten gibt es zahlreiche Arten der Schüttelinkubation, die mehr oder minder starke Temperaturgradienten von well zu well aufweisen. Temperaturgradienten führen dazu, dass in den einzelnen Reaktionsräumen der Versuchsanordnung nicht die gleichen Wachstumsbedingungen vorliegen, was die Untersuchungsergebnisse verfälscht. In dieser Arbeit wurde mit dem 2- bzw. 4-Platten-Thermoshaker (Kisker, PST-60HL plus) gearbeitet (Abb. 9, S. 33). Die Temperatureffekte waren klein und die Fehler über zahlreiche Vorversuche berechenbar. Mittels 8-Kanal-Pipette konnte der zellfreie Überstand aus einer Mutanten-Kultivierungsplatte direkt in die *E. coli*-Test-Platte überführt werden (Abb. 16, S. 49). Die Zentrifugation der Mutanten-Zellsuspensionen erfolgte in einer Zentrifuge mit 96 well Platten Einsatz (bis zu 8 Platten gleichzeitig). Ein automatisches 96 well Spektralphotometer (Easy Reader), kann die Extinktion<sub>550</sub> der 96 wells einer Platte in weniger als 10 sek messen (Trübungsmessung). Um die optimalen Wachstumsbedingungen für *E. coli* B834 in 96 well Platten zu ermitteln, wurden beispielhaft Tests mit einer bestimmten Met-Konzentration in allen wells unter Veränderung der Parameter Zeit, Temperatur und Schüttelfrequenz durchgeführt. Die optimalen Versuchsbedingungen lagen bei 6-7 h, 35 °C und 1100 rpm. In jeder *E. coli*-Testplatte zur Vermessung von Mutanten auf Met-Bildung wurde eine Reihe mit Met-Standards (Ausschnitt einer Kalibrierkurve) mitgeführt, um die Extinktion unbekannter Proben definierten Met-Konzentrationen zuordnen zu können. Mit der 96 well Platten Methodik können pro Person bis zu 6000 Mutanten/ Monat auf Met-Bildung untersucht werden. Bei der Entwicklung des Tests wurde verstärkt auf die Robotertauglichkeit der einzelnen Arbeitsschritte Wert gelegt. Die Validierung des *E. coli*-Tests im 96 well Maßstab erfolgte über die mehrfache Aufnahme von Kalibrierkurven innerhalb einer Platte verglichen mit Kalibrierkurven anderer Platten. Eine Prüfung der positiven *E. coli* Test-Befunde mittels GC schloss sich routinemäßig an.

### **5.3.2.a Entwicklung des *E. coli* B834-Tests zum Methionin-Nachweis**

Ziel war es, den hohen Kosten- und Zeitaufwand für die Derivatisierung aminosäurehaltiger Proben in Vorbereitung auf die GC-Messung zu senken. Die reinen Material-Kosten für eine Derivatisierung (EZ:faast GC-FID, Phenomenex, Aschaffenburg) betragen etwa 5 € und der Zeitaufwand für die parallele Bearbeitung von 4 Derivaten beträgt ca. 25 min. Dazu kommt



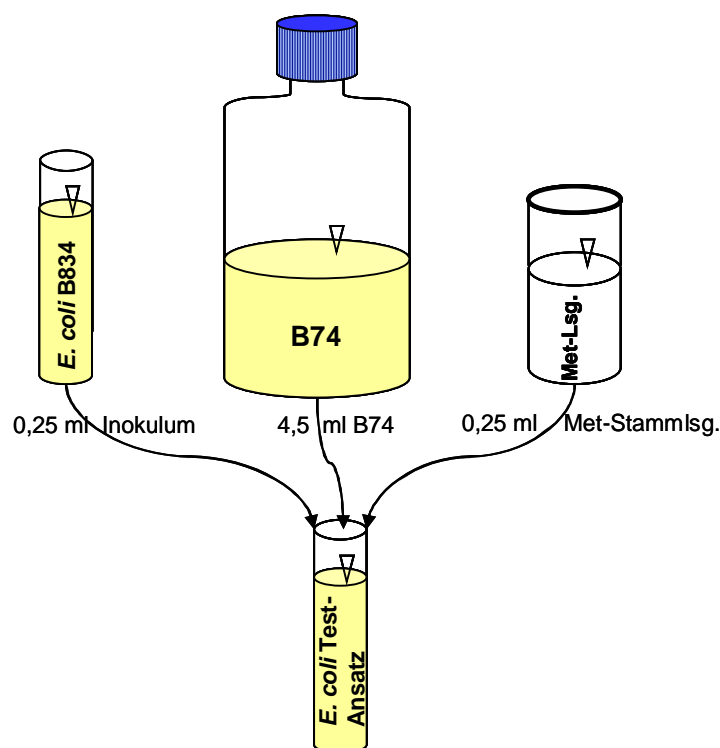
noch die Zeit für die GC-Messung jeder einzelnen Probe. Im Vergleich zu gängigen HPLC-Analysezeiten ist diese Prozedur kurz, aber für ein Screening noch immer zu lang.

Der Zusammenhang zwischen Wachstum von *E. coli* B834 und der im Wachstumsmedium vorhandenen Methionin-Konzentration wurde bereits in Abschnitt 4.5.12 auf S. 47ff. geschildert. Eine wichtige Voraussetzung für ein gelungenes Screening mit Hilfe von *E. coli* B834 war die reproduzierbare Herstellung des *E. coli* Inokulums, mit dem jeder Test auf Methionin (Met) beimpft wurde (Abschnitt 4.5.12.a, S. 48). Das Inokulum sollte folgende Voraussetzungen erfüllen: Die Fitness der Zellen sollte einen sofortigen Wachstumsstart ermöglichen, und es durften keine lysierten Zellen enthalten sein, die den Met-Nachweis durch freigesetztes Met stören würden. Dies ist bei Zellen zu Beginn der exponentiellen Phase gegeben. Bei Animpfung des Tests mit dem *E. coli* Inokulum durfte es nicht zu versteckter Einschleppung von Met in Form komplexer Mediumbestandteile kommen, d.h. das Inokulum musste in Minimalmedium hergestellt sein. Da ein Hochdurchsatzscreening zum Auffinden von Met-Überproduzenten angestrebt wurde, war es von Vorteil, zu jeder Zeit ein ausreichend großes Volumen Inokulum in gleichbleibend guter Qualität zur Verfügung zu haben. Dies wurde durch die reproduzierbare Herstellung einer *E. coli* B834 Zellsuspension mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 0,6-0,7 erreicht, die in B74-Minimalmedium ausgehungert und für 4 Wochen bei 4 °C haltbar war. Das Inokulum musste immer die gleiche Extinktion von 0,6-0,7 haben, da ansonsten die damit hergestellten Kalibrierkurven -in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen- eine stark unterschiedliche Steigung aufweisen. Das fertige Inokulum wurde immer mit 4 °C eingesetzt, da sonst die optimale Inkubationsdauer für den *E. coli* Test differierte. Wenn es z.B. direkt nach seiner Herstellung 30 °C warm eingesetzt wurde, verkürzte sich die Inkubationsdauer des Tests um mehr als 1 h und die Zellen vom *E. coli* B834 begannen zu früh mit der Zell-Lyse. Es war also von großer Wichtigkeit, dass auf gleichbleibende Temperaturen geachtet wurde. Durch Substanzen, die durch eine Zell-Lyse freigesetzt werden, war der Met-auxotrophe Stamm *E. coli* B834 in der Lage, sich mit Met-haltigen Komponenten zu versorgen. Das 2malige Waschen in 0,9 %iger NaCl-Lösung nach der Kultivierung in Medium 53 war erforderlich, um komplexe Bestandteile des Mediums zu entfernen. Das Aushungern der Zellen in Minimalmedium B74 diente dem Zweck, möglichst das gesamte im Zellinneren frei verfügbare und gespeicherte Met durch lebenserhaltende Stoffwechselprozesse zu verbrauchen. Die Zellen durften aber nicht durch ein zu lange andauerndes Aushungern in die Zell-Lyse eintreten, es musste ein

Kompromiss zwischen ausreichendem Met-Verbrauch und Fitness der Zellen gefunden werden. Es wurde erkannt, dass verschiedene Kalibrierkurven, die mit identischen Standards und gleichem *E. coli* Inokulum hergestellt wurden, trotzdem geringe Unterschiede in der Steigung der Kurve aufwiesen. Um in jedem *E. coli* Test einen Überblick über die Qualität des Inokulums zu behalten und den Schwellenwert für Met in Form einer bestimmten Extinktion zu erkennen, sollte in jedem Test eine Kalibrierkurve oder eine Positivkontrolle mitlaufen. Die zu vermessende Probe muss dabei genauso behandelt werden wie jeder Standard der Kalibrierkurve. Da der Wildtyp DSM 20300 ca. 1-3 mg/l Met in Minimalmedium bildet, ist ein mit jeder Kalibrierkurve nachzuweisender Bereich von 10-100 mg/l Met wünschenswert. Bei der Vermessung zellfreier Überstände bzw. Met-Standards mit Hilfe des mikrobiologischen *E. coli* B834 Tests stellten sich folgende Fragen:

- Welches Volumen an zellfreiem Überstand bzw. Standard soll eingesetzt werden?
- Bei welcher Temperatur soll die Inkubation erfolgen?
- Wie lange soll inkubiert werden?
- Welche Rührgeschwindigkeit oder Schüttelfrequenz ist geeignet?

Der Test wurde im Reagenzglas-Maßstab entwickelt.



**Abb. 33:** Pipettierschema für den Met-Nachweis im Reagenzglas-Maßstab

Das Arbeitsvolumen im Reagenzglas (RG) betrug 5 ml; es setzte sich aus 3 Komponenten zusammen (Abb. 33, S. 90):

- 4,5 ml B74-10 % H<sub>2</sub>O (90 %)
- 0,25 ml *E. coli* Inokulum (5 %)
- 0,25 ml Met-Stammlösung (5 %)

In einem Reagenzglasständer mit 6 x 4 möglichen Reagenzglas-Stellpositionen wurden 12 Positionen für die Erstellung einer Kalibrierkurve im Doppelansatz genutzt (Tab. 13, S. 91). Die 12 restlichen Positionen standen für die Vermessung zellfreier Kultivierungsüberstände zur Verfügung. Ein solcher 24er Ständer wurde auf einen RCT basic-Magnetrührer (IKA, Staufen) gestellt und mit Klebeband fixiert. Die Magnetrührkerne in jedem einzelnen Reagenzglas sorgten für die Durchmischung der Suspension während der Inkubation des Tests.

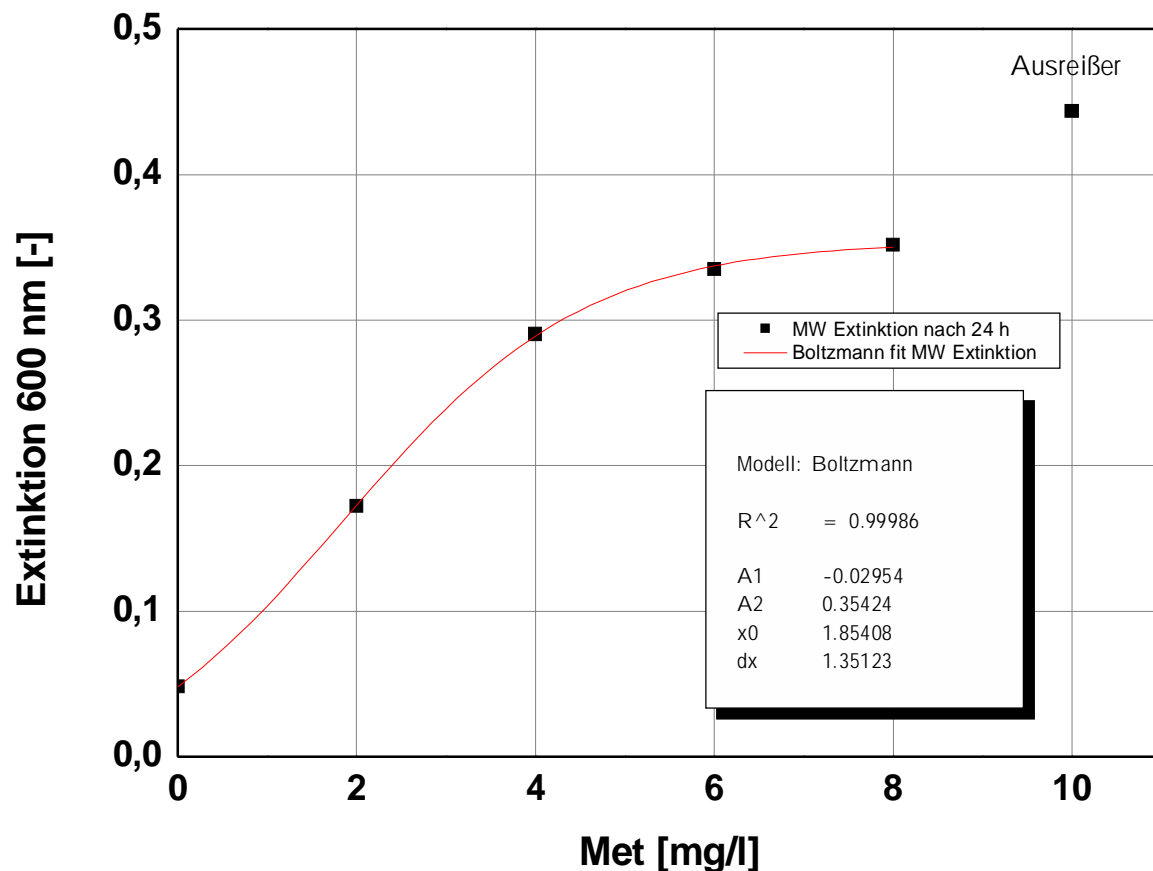
Es erfolgte die Aufnahme einer Kalibrierkurve im Doppelansatz für die Met-Konzentrationen 0, 40, 80, 120, 160 und 200 mg/l Met in Wasser für 24 h, 30 °C und 300 rpm (Magnetrührer, IKA, Staufen) in einem 24er Reagenzglasständer (Tab. 13, S. 91; Abb. 34, S. 92).

**Tab. 13:** Schematische Darstellung eines Reagenzglasansatzes mit 6x 4 Stellflächen; 2 Reihen wurden mit Reagenzgläsern steigender Met-Konzentration [mg/l] versehen

0	40	80	120	160	200
0	40	89	120	160	200

Die Inkubation erfolgte im Klimaschrank (tritec, Hannover). Es wurde eine Mischung für 13 Reagenzgläser aus 90 % B74 – 10 % H<sub>2</sub>O und 5 % *E. coli* Inokulum hergestellt, gut durchmischt und je 4,75 ml auf 12 Reagenzgläser mit je einem 1 cm Magnetrührkern für die Aufnahme der Kalibrierkurve verteilt. Jeweils 2 Reagenzgläser wurden mit 0,25 ml einer Met-Konzentration bzw. Wasser versetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte nach 24 h bei 600 nm im Spektralphotometer PM 2 A von Zeiss (Göttingen) gegen B74-Medium als Leerwert. Bei den auf der Abszisse der Abb. 34 (S. 92) dargestellten Met-Konzentrationen

handelt es sich um die Met-Endkonzentrationen in jedem 5 ml Ansatz pro Reagenzglas. Um die Met-Konzentration in der ursprünglich im Test eingesetzten Probe (5 % Volumenanteil am Gesamtansatz von 5 ml) zu ermitteln, muss der Faktor 20 berücksichtigt werden.



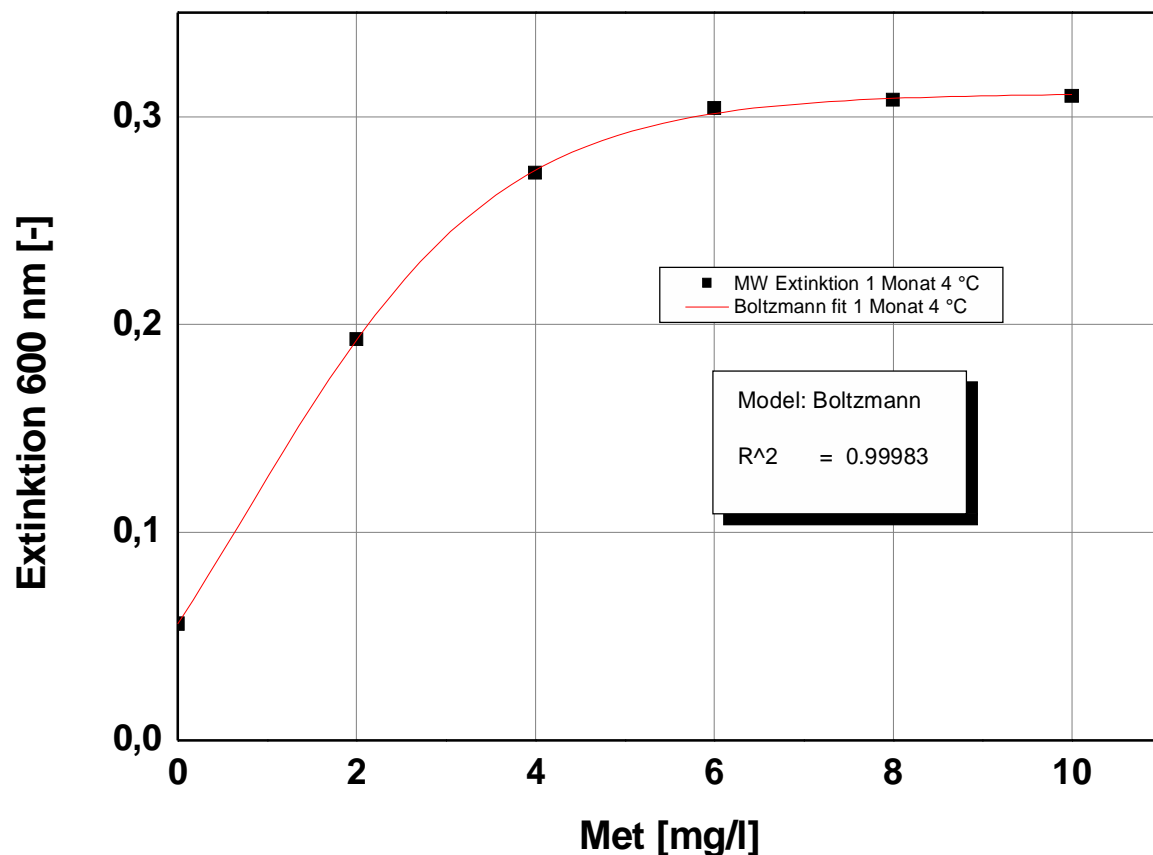
**Abb. 34:** Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit der Korrelation der Extinktion<sub>600</sub> von *E. coli* B834 im Spektralphotometer Zeiss (Göttingen) mit der Met-Konzentration im 5 ml Gesamtansatz des Reagenzglases; Inkubation 24 h 30 °C 300 rpm im Klimaschrank (tritec, Hannover); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Jeder Punkt in Abb. 34 (S. 92) ist der Mittelwert aus zwei Einzelwerten des Doppelansatzes. Die Mittelwerte wurden mit einem sigmoidalen fit nach Boltzmann in Form einer Kurve gemittelt. Ein sigmoidaler fit nach Boltzmann gibt den Zusammenhang zwischen Extinktion und Met-Konzentration sehr gut wieder. Die allgemeine Formel für eine Boltzmann Funktion mit sigmoidalem Wachstum lautet:

$$y = A2 + (A1-A2)/(1 + \exp((x-x0)/dx))$$

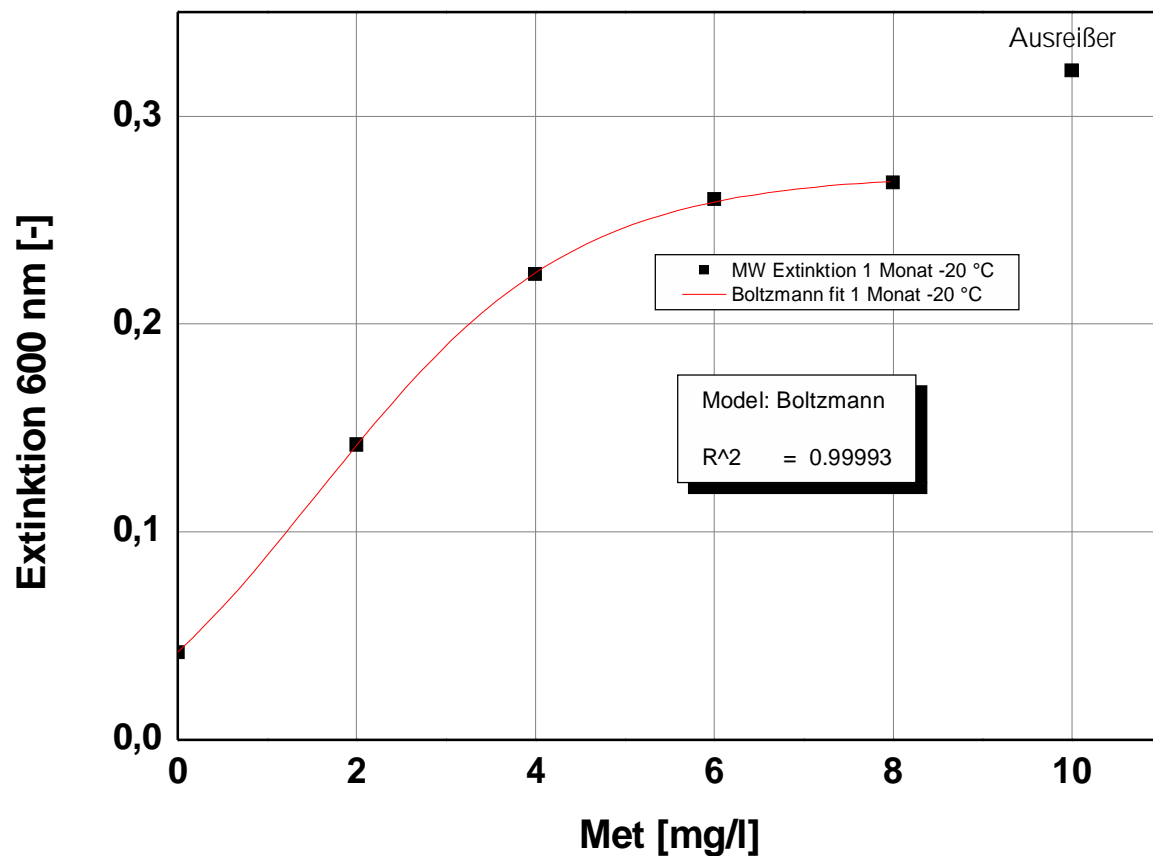
Die Werte für  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $x_0$  und  $dx$  sind in Abb. 34 (S. 92) angegeben. Durch Auflösung der Funktionsgleichung nach  $x$  lässt sich für jede Extinktion<sub>600</sub> im Bereich von etwa 0,1 – 0,4 die zugehörige Met-Konzentration rechnerisch ermitteln. In diesem Versuchsbeispiel konnten Pseudo-unbekannte Met-haltige Proben mit einem Fehler von maximal -20 % ermittelt werden. Der Punkt in Abb. 34 (S.92) bei einer Konzentration von 10 mg/ Met wurde als Ausreißer gewertet und nicht in den sigmoidalen fit nach Boltzmann einbezogen. Durch Aufnahme zahlreicher Kalibrierkurven konnte festgestellt werden, dass die drei ersten Werte jeder Kalibrierkurve (0, 2 und 4 mg/l Met) die verlässlichsten für die Erstellung der Kurvengleichung als Grundlage der Bestimmung unbekannter Met-haltiger Lösungen sind. Es handelt sich um den Bereich der stärksten Steigung. Der Versuch, die ersten Wertepaare der Korrelation zwischen Extinktion und Met-Konzentration in Form einer Gerade zu beschreiben und mit Hilfe einer zugehörigen Geradengleichung die unbekannte Met-Konzentration zu ermitteln, führte zu der Erkenntnis, dass die Boltzmann-Gleichung den Zusammenhang auch im niedrigen Konzentrationsbereich mit geringeren Fehlern wiedergibt als eine lineare Korrelation.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Lagerung des Inokulums für 4 Wochen bei 4 °C oder bei -20 °C besser ist. Für die Erstellung der zwei folgenden Kalibrierkurven (Abb. 35, S. 94) und Abb. 36, S. 95) wurde ein 4 Wochen bei 4 °C gelagertes und ein 4 Wochen bei -20 °C gelagertes Inokulum eingesetzt.



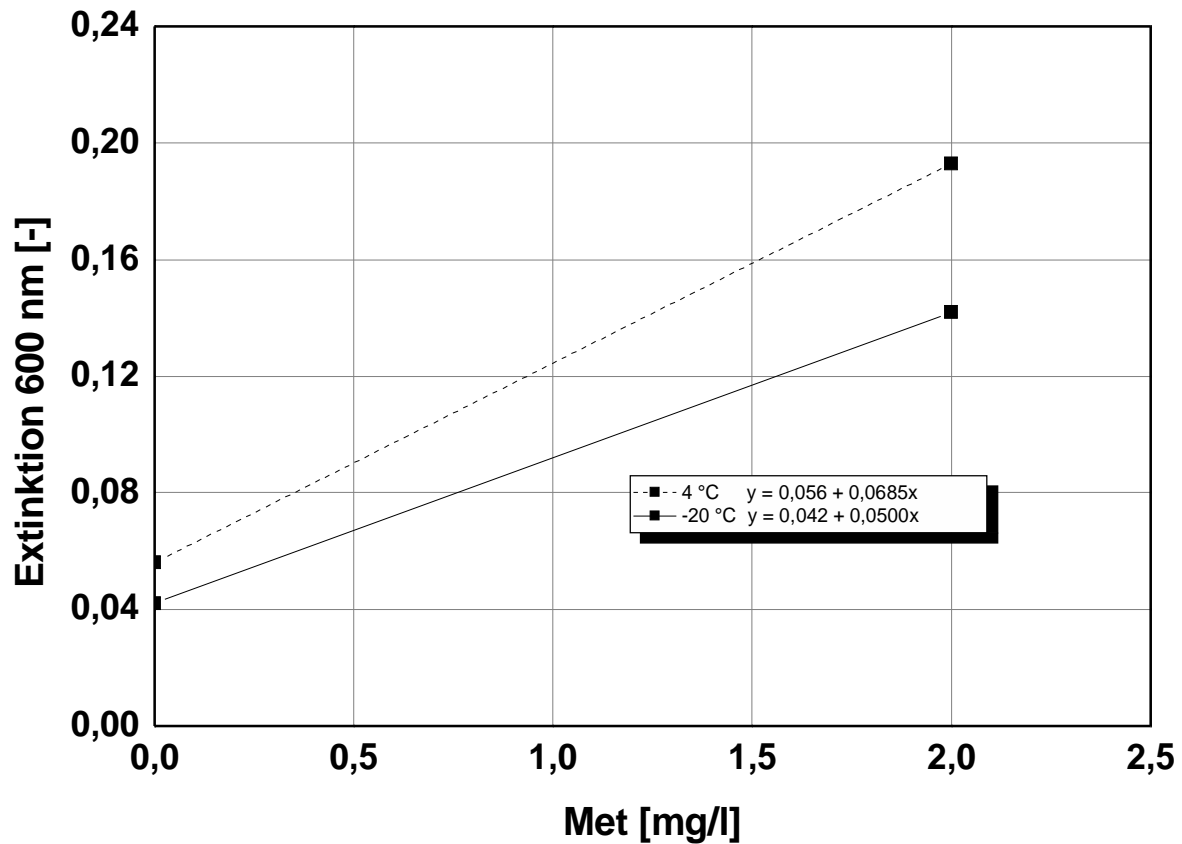
**Abb. 35:** Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit einem **4 Wochen bei 4 °C gelagerten Inokulum**; Inkubation 24 h 30 °C 300 rpm im Klimaschrank (tritec, Hannover); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Die Kurvenverläufe in Abb. 35 (S. 94) und 36 (S. 95) sind sehr ähnlich. Jeder Punkt ist der Mittelwert aus den Extinktionen des Doppelansatzes der Kalibrierung. Der Korrelationskoeffizient ist in der Kurve der Abb. 35 mit  $R = 0,9998$  nahe zu 1, in Abb. 36 bei -20 °C Lagerung bei  $R = 0,9999$ .



**Abb. 36:** Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit einem **4 Wochen (ohne Glycerin) bei -20 °C gelagerten Inokulum**; Inkubation 24 h 30 °C 300 rpm im Klimaschrank (tritec, Hannover); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

In der folgenden Abb. 37 (S. 96) wurden der jeweils lineare Bereich der Kalibrierkurve aus den Abb. 35 und 36 dargestellt. Die Steigung der Geraden beträgt bei der 4 °C Lagerung 0,0685 und bei der -20 °C Lagerung 0,05. Nach Division beider Werte wurde der Faktor der Lagerschädigung ermittelt; er beträgt 1,37, d.h. bei 4 °C Lagerung ist die Steigung der Kalibriergerade 1,37x so hoch wie bei der -20 °C Lagerung. Da die -20 °C Lagerung zusätzlich eine erhöhte Gefahr von lysierten Zellen birgt, die den Met-Nachweis im *E. coli* Test negativ beeinflussen würden, erschien eine 4 °C-Lagerung des Inokulums für die Routineanwendung geeigneter als die bei -20 °C.

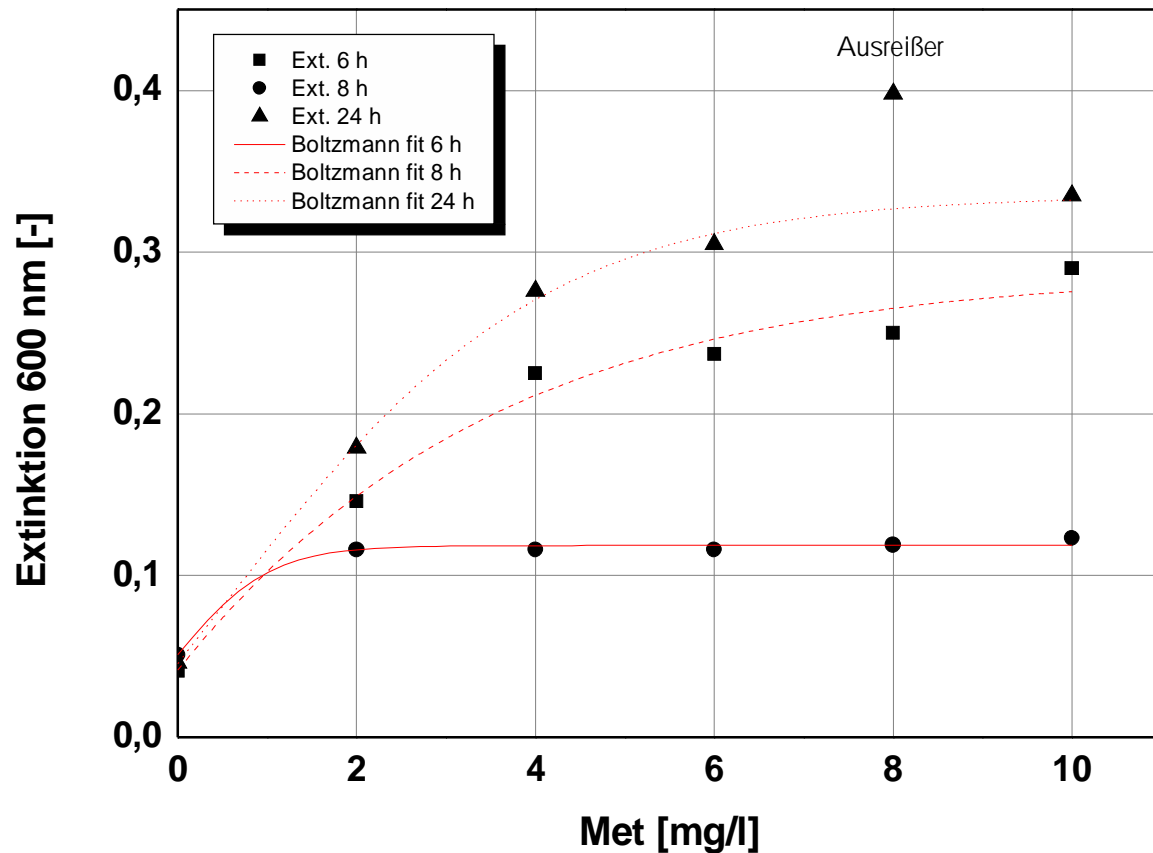


**Abb. 37:** Steigung des Anfangsbereichs der Kalibrierkurve in Abb. 35 (S. 94) und 36 (S. 95)

Bei dem Versuch, zellfreie Kultivierungsüberstände von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp auf Met-Bildung zu vermessen bzw. mit dem *E. coli* Test das Ergebnis der gaschromatographischen Vermessung von nur 1-3 mg/l Met zu reproduzieren, wurde festgestellt, dass eine Inkubation des Tests und der zu vermessenden Proben von 24 h bei 30 °C zu lang war. Standards von Met in Wasser ließen sich zwar auf diesem Weg nachweisen, aber nach einer Inkubation von 24 h waren die Messwerte für einen unverdünnten zellfreien Kultivierungsüberstand von DSM 20300 außerhalb des Messbereichs. Der *E. coli* Test wies mit einer Extinktion<sub>600</sub> größer 0,4 mehr als 200 mg/l Met nach, obwohl sich kein Met in der Lösung befand (Daten nicht gezeigt). Vermutlich konnte *E. coli* B834 in diesem Zeitraum bereits Proteine lysierter DSM 20300-Zellen verstoffwechseln, wodurch der Met-Auxotrophe ausreichend Met für sein Wachstum erhielt. Um Mutanten vom Wildtyp im Test unterscheiden zu können, muss aber der Kultivierungsüberstand des DSM 20300 Wildtyps als 0 mg/l Met (Negativkontrolle) definiert werden. Eine Verkürzung der Inkubationszeit auf 18 h konnte den Messwert für den Wildtyp



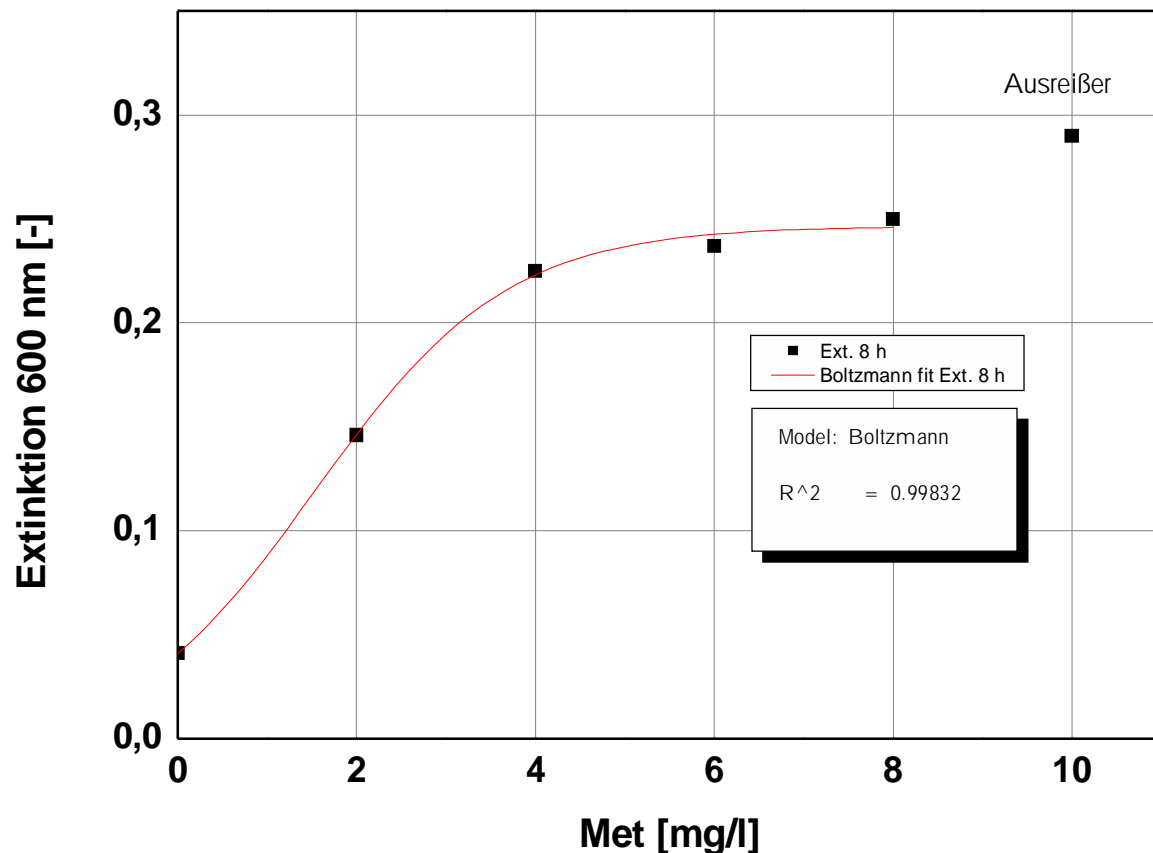
deutlich erniedrigen, so dass er sich im untern Drittel der Kalibrierkurve befand. Eine Verdünnung des Überstandes von 1:2, 1:5 und 1:10 brachte kaum eine Verbesserung gegenüber der Vermessung der unverdünnten Probe; Gleiches galt für eine Erniedrigung der Temperatur von 30 °C auf 25 °C bei einer Dauer von 24 h und 300 rpm. Das Ergebnis des 18 h Versuchs deutete darauf hin, dass bei Durchführung von Kurzzeitversuchen unter 12 h eine deutliche Verbesserung zu erwarten sein dürfte. Es wurde untersucht, wie sich die Steigung der Kalibrierkurve von *E. coli* B834 entwickelt bei 6 und 8 h Inkubation im Vergleich zur 24 h Inkubation bei 30 °C und 300 rpm im Reagenzglasmaßstab (Abb. 38, S. 97):



**Abb. 38:** Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit der Korrelation der Extinktion<sub>600</sub> von *E. coli* B834 im Spektralphotometer Zeiss (Göttingen) mit der Met-Konzentration im 5 ml Gesamtansatz des Reagenzglases; Inkubation 6, 8 und 24 h 30 °C 300 rpm im Klimaschrank (tritec, Hannover)

In Abb. 38 (S. 97) ist zu erkennen, dass mit Zunahme der Inkubationsdauer die Unterscheidbarkeit der Met-Konzentrationen zunimmt. Am kleinsten sind die Unterschiede

nach nur 6 h; es ist zwar ein Unterschied zwischen 0 mg/l Met und irgendeiner Met-Konzentration  $> 0$  mg/l Met zu erkennen, aber 2 mg/l lassen sich kaum von 10 mg/l unterscheiden. Nach 8 h 30 °C und 300 rpm ist eine gute Kalibrierkurve erzielt worden.



**Abb. 39:** Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit der Korrelation der Extinktion<sub>600</sub> von *E. coli* B834 im Spektralphotometer Zeiss (Göttingen) mit der Met-Konzentration im 5 ml Gesamtansatz des Reagenzglases; Inkubation 8 h 30 °C 300 rpm im Klimaschrank (tritec, Hannover); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Abb. 39 (S. 98) zeigt den Boltzmann fit der 8 h Kurve aus Abb. 38 (S. 97). Mit der daraus entstehenden Gleichung ließ sich der zellfreie Überstand vom Wildtyp des Stammes DSM 20300 (Zellsuspension Extinktion<sub>600</sub> 1) sowohl unverdünnt als auch 1:2 verdünnt mit einer Extinktion von 0,04 im *E. coli* Test nahe 0 mg/l Met nachweisen. Der Versuch konnte 2x reproduziert werden. Damit ist klar, dass die Herstellung einer Kalibrierkurve mit *E. coli* B834 nur ein Kurzzeitversuch von ca. 8 h sein kann, um Met in zellfreien Überständen zu vermessen. Bei längeren Inkubationszeiten verfälschen offensichtlich Zell-lytische

Produkte den Test. Eine Standardaddition von Met-Lösungen zu dem zellfreien Überstand einer DSM 20300 Wildtyp-Kultivierung als Untergrund ist möglich, allerdings gibt es z. T. Sprünge in der Extinktion, die zu Nachweisfehlern von bis zu 30 % führen.

Optimierungsversuche ausgehend von der Versuchsvariante 8 h 30 °C 300 rpm im Klimaschrank (tritec, Hannover) hinsichtlich einer Erhöhung der Rührerdrehzahl und einer Temperaturerhöhung zeigten:

- 400 rpm zeigt keine Verbesserung gegenüber 300 rpm
- 37 °C führt zu leicht beschleunigtem Wachstum gegenüber 30 °C
- Die Entwicklungsschritte des *E. coli* Tests zur Erstellung einer optimalen Kalibrierkurve im Reagenzglas-Maßstab sind in der Abb. 1, Abschnitt 9.3.1, S. 162 des Anhangs zusammengefasst
- Die Entwicklung verlief in mehreren Stufen über 24 h Versuche zu Kurzzeitversuchen
- Versuche mit einer Inkubationsdauer von mehr als 16 h sind nicht auswertbar, wenn zellfreie Überstände vermessen werden, da in diesem Fall der Met-auxotrophe Organismus *E. coli* B834 mit zell-lytischen Bestandteilen der Probe wachsen kann, wobei die Korrelation zwischen *E. coli* Wachstum und eingesetzter Met-Konzentration verloren geht
- Unter den durchgeführten Versuchen im Reagenzglas-Maßstab ist die Variante 8 h, 30 °C und 300 rpm die beste, wenn man die Erkenntnisse aus der Vermessung zellfreier Überstände berücksichtigt

Die Nachteile des *E. coli* Tests im Reagenzglas-Maßstab liegen im Zeit- und Materialaufwand:

- umfangreiche Pipettierschritte mit Einkanalpipetten
- größerer Materialaufwand bei Befüllung eines Reagenzglases mit 5 ml
- bei Herstellung von zellfreien Mutanten-Kultivierungsüberständen Zentrifugation einzelner 1,5 ml Reaktionsgefäße (24 pro Rotor)
- sehr begrenzte Anzahl der pro Person möglichen Probenbearbeitungen (300/Monat)
- einzelne Extinktionsmessung jeder Probe notwendig

Diese Nachteile führten zu dem Ziel, den mikrobiologischen Test zum Met-Nachweis in den 96 well Maßstab zu übertragen. Es zeigten sich enorme Vorteile des *E. coli* Tests im 96 well Maßstab gegenüber dem Test im Reagenzglas-Maßstab:

- Minimierung des Arbeits- und Zeitaufwandes beim Pipettieren durch Einsatz von Mehrkanalpipetten
- geringerer Materialaufwand, da ein Reaktionsraum nur mit 200 µl befüllt wird
- bei Herstellung von zellfreien Mutanten-Kultivierungsüberständen Zentrifugation von 96 well Platten in einer Zentrifuge mit Rotor für insgesamt 8x 96 well Platten
- hoher Probendurchsatz pro Person möglich (bis zu 6000/Monat)
- automatische Extinktionsmessung ganzer 96 well Platte möglich

Es ergeben sich aber auch einige Probleme durch die Verkleinerung des Maßstabs:

- eine manuelle Entnahme des zellfreien Überstandes in einem Volumen von nur 200 µl, ohne Bestandteile des Zellpellets hochzureißen, gestaltet sich schwierig; hilfreich war die Konstruktion einer speziellen Pipettiervorrichtung (Eigenbau, Institut für Technologie, siehe Abb. x Abschnitt 4.5.12.b). Die 8-Kanalpipette wurde in einer höhenverstellbaren Höhenfixierungsschiene eingehängt, so dass sich die Pipettenspitzen in genau definierter Eintauchtiefe im zellfreien Überstand in sicherer Entfernung über dem Zellpellet befanden; durch Verschieben der Pipette in der Fixiervorrichtung nach rechts oder links konnten alle Spalten einer 96 well Platte bearbeitet werden
- trotz Einsatz des vorgefertigten Deckels der 96 well Platte ist durch ein größeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis die Verdunstungsrate erhöht; außerdem kann es durch intensives Schütteln zu Kreuzkontaminationen von well zu well kommen; denkbare Versuchsansätze zur Einschränkung von Verdunstungsverlusten sind kürzere Inkubationszeiten und eine Verringerung der Schüttelfrequenz
- Geringes Volumen von 200 µl erfordert sehr präzises Arbeiten; durch das Medium bedingte Schwebstoffe und selbst kleine Luftblasen, die durch das Schütteln der 96 well Platte entstehen können, verfälschen die Extinktionsmessung erheblich nach oben

Da es sich bei *E. coli* allgemein um einen fakultativ anaeroben Organismus handelt, wurde getestet, ob eine Met-Kalibrierkurve im 96 well Maßstab auch ohne Schütteln während der Inkubation möglich ist. Es zeigten sich bei 20 °C und 30 °C Tendenzen der Extinktion in Richtung steigender Met-Konzentration, aber die well-zu-well-Unterschiede waren zu groß. Der Inhalt der wells sollte im Verlauf des Tests durchgehend gut durchmischt werden, um eine hohe Reproduzierbarkeit der erzielten Extinktionen nach definierten Inkubationsbedingungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Met-Konzentration zu gewährleisten. Die Verdunstung in den 96 well Platten war bei 30 °C und Versuchen, die über 8 h dauerten, relativ groß; das Zukleben mit Acetatfolie konnte neben der Verdunstung auch das Problem möglicher Kreuzkontaminationen erheblich einschränken. Kondenswasserbildung an der Folieninnenseite ließ sich allerdings nicht komplett ausschließen. Es wurden Kalibrierkurven nach Vorbild des Reagenzglas-Tests im 96 well Maßstab aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch Vermessung im Easy Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm. Das Arbeitsvolumen der 96 well Platte setzte sich aus drei Komponenten zusammen:

180 µl B74-10 % H<sub>2</sub>O (90 %)

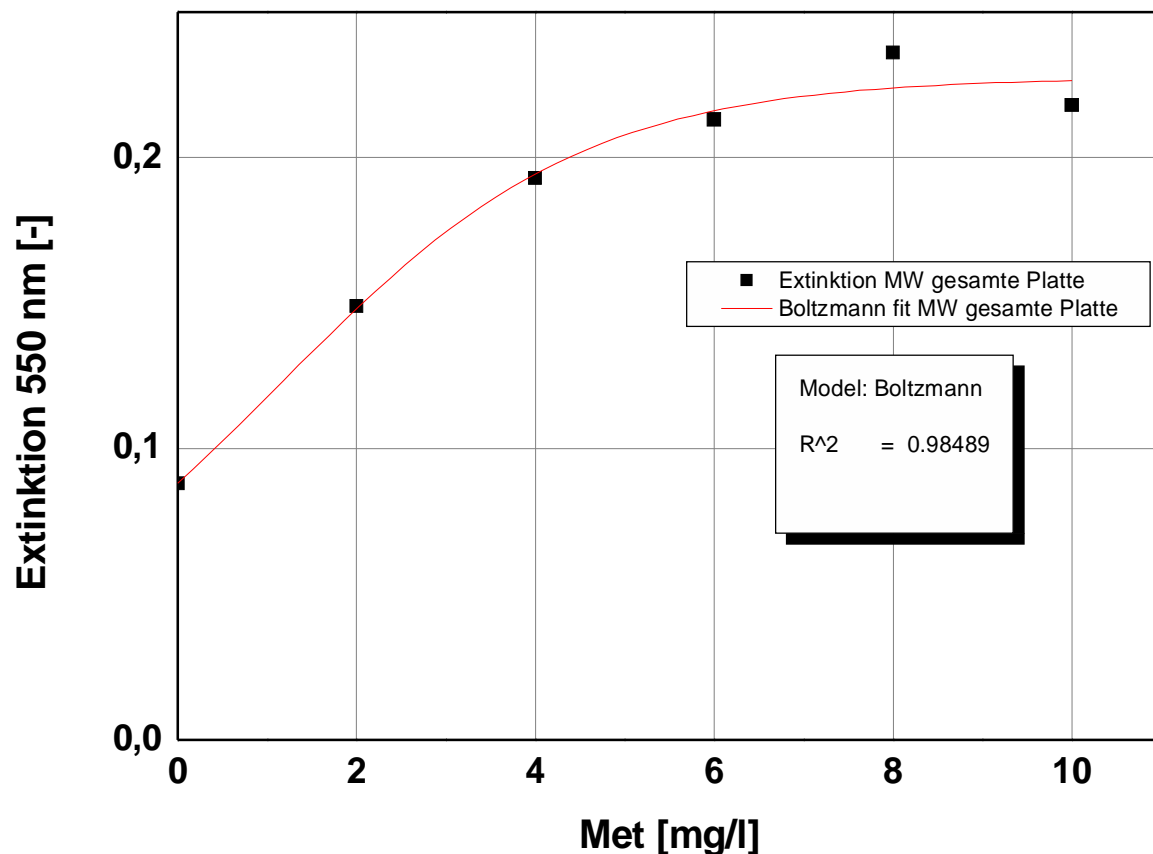
10 µl *E. coli* Inokulum (5 %)

10 µl Met-Stammlösung (5 %)

200 µl je Reaktionsraum

Nach Herstellung eines Gemisches aus 90 % B74 – 10 % H<sub>2</sub>O und 5 % *E. coli* Inokulum wurden davon 190 µl pro well mit Hilfe einer elektronischen 8-Kanal-Pipette in der gesamten 96 well Platte vorgelegt, mit 10 µl der entsprechenden Met-Stammlösung versetzt, und mit einer Acetat-Folie verschlossen. Im folgenden Versuch (Abb. 40, S. 102) wurden je 2 Spalten einer 96 well Platte für eine bestimmte Met-Konzentration verwendet, so dass sich bei 6 Konzentrationen und 12 Spalten pro Platte 8 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven ergeben, welche zu einer Mittelwert-Kalibrierkurve zusammengefasst werden können. Ein Punkt im Diagramm ist also der Mittelwert aus 16 einzelnen Extinktionen (2 Spalten á 8 Reihen). Folgende Met-Konzentrationen wurden für die Erstellung der Kalibrierkurven eingesetzt: 0, 2, 4, 6, 8 und 10 mg/l Met Endkonzentration im well mit einem Gesamtvolumen von 200 µl. Da im Test nur 5 % einer Met-Stammlösung eingesetzt werden, ist die Konzentration der tatsächlich eingesetzten Lösung 20mal so hoch wie die Werte auf der

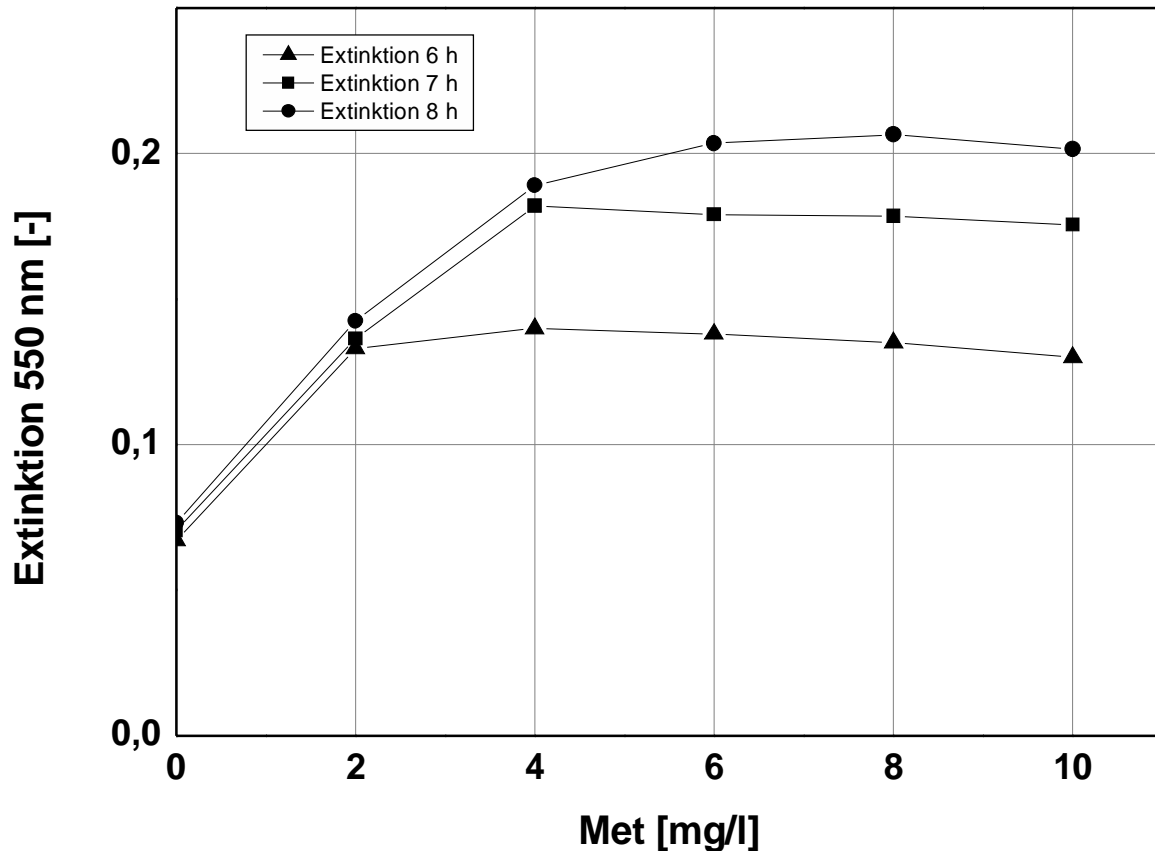
Abszisse der Abb. 40 (= 0, 40, 80, 120, 160 und 200 mg/l Met-Stammlösung). Ein Volumen von 200 µl wird ausgehend von 4 °C viel schneller auf die Inkubationstemperatur von z.B. 30 °C erwärmt als dies im 5 ml Reagenzglas-Maßstab der Fall ist.



**Abb. 40:** Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurve in B74-Medium mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader (Tecan, Crailsheim) mit der Met-Konzentration im 200 µl Gesamtansatz je well; Spalte 1, 2 = 0 mg/l, 3, 4 = 2 mg/l, 5, 6 = 4 mg/l, 7, 8 = 6 mg/l, 9, 10 = 8 mg/l und 11, 12 = 10 mg/l Met Endkonzentration im Volumen von 200 µl. Inkubation 8 h 30 °C 800 rpm mit IKA-Minishaker und 96 well Platten Aufsatz (IKA, Staufen) im Klimaschrank (tritec, Hannover); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Neben der deutlichen Maßstabsverkleinerung ist ein weiteres Optimierungsziel im 96 well Maßstab die Verkürzung der Inkubationsdauer bei gleichzeitig guter Unterscheidbarkeit verschiedener Met-Konzentrationen; eine positive Begleiterscheinung wäre die Minimierung von Verdunstungsverlusten. Hauptziel ist das Überschreiten einer bestimmten Met-Schwelle, um Produzenten von Nicht-Produzenten abgrenzen zu können; es

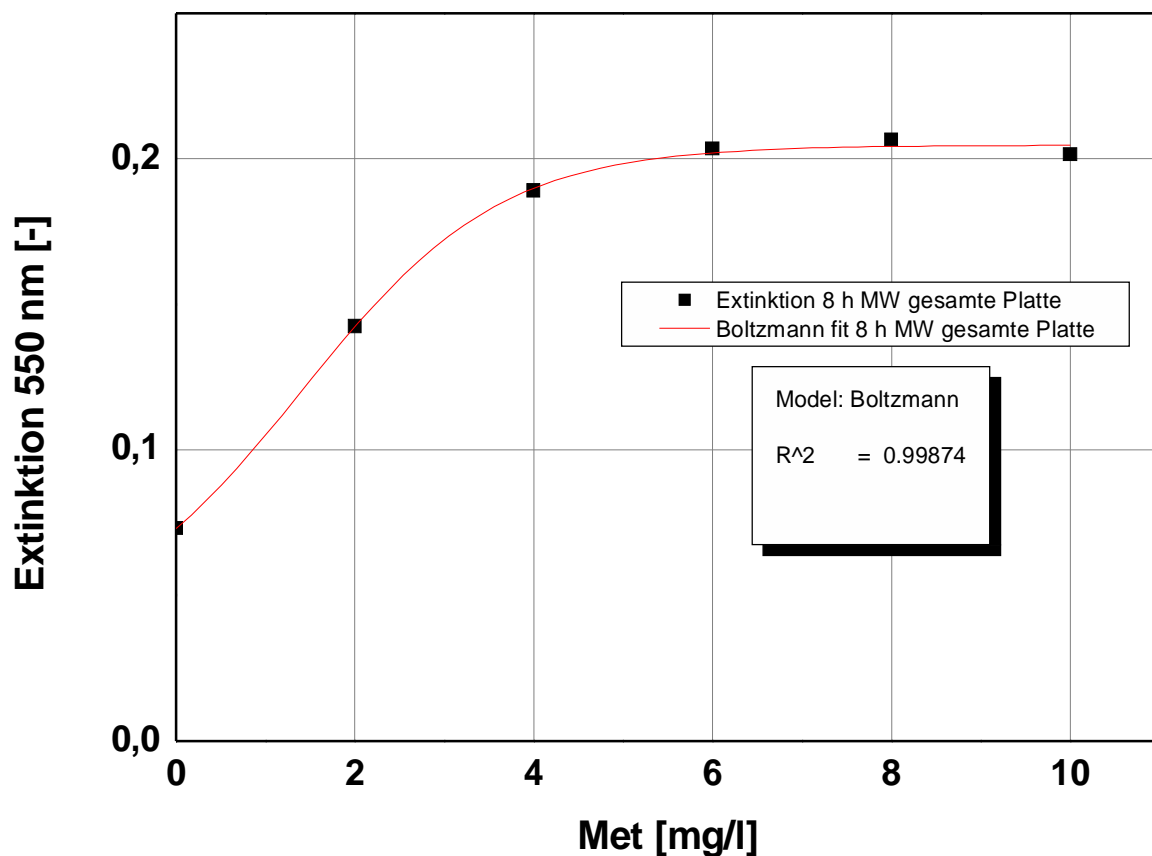
geht bei der Vorselektion Met-überproduzierender Mutanten nicht um absolute Konzentrationen; diese werden bei Bedarf mittels GC-Analytik bestimmt.



**Abb. 41:** Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium der Reihen A-D und F-H nach 6, 7 und 8 h mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader (Tecan, Crailsheim) mit der Met-Konzentration im 200 µl Gesamtansatz je well; Spalte 1, 2 = 0 mg/l, 3, 4 = 2 mg/l, 5, 6 = 4 mg/l, 7, 8 = 6 mg/l, 9, 10 = 8 mg/l und 11, 12 = 10 mg/l Met Endkonzentration im Volumen von 200 µl. Inkubation 6, 7 und 8 h 30 °C 700 rpm mit IKA-Minishaker und 96 well Platten Aufsatz (IKA, Staufen) im Klimaschrank (tritec, Hannover); in Reihe E wurde der zellfreie Überstand von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp unverdünnt vermessen (Daten nicht gezeigt)

In Abb. 41 (S. 103) ist erkennbar, dass es eine bestimmte Mindest-Inkubationszeit erfordert, um verschiedene Met-Konzentrationen durch Wachstum des Testorganismusses voneinander unterscheiden zu können. In diesem Beispiel bei 30 °C und 700 rpm sind nach 6 h nur 0 und 2 mg/l unterscheidbar, ab 7 h hebt sich 4 mg/l deutlich von 2 mg/l ab und erst ab 8 h Inkubation ist auch die Konzentration 6 mg/l von den darunter liegenden Konzentrationen zu

unterscheiden. Der Unterschied zwischen 6, 8 und 10 mg/l ist bei den gewählten Inkubationsbedingungen nur gering. Die Vermessung des zellfreien Überstandes einer Kultivierung von DSM 20300 Wildtyp in Reihe E der 96 well Platte (8 h, 30 °C, 700 rpm) ergab als Mittelwert eine Extinktion<sub>550</sub> von 0,08 und befindet sich in Bezug auf die damit korrelierende Met-Konzentration nahe 0 mg/l Met. Der in Abb. 41 (S. 103) dargestellte Versuch konnte mit gleichen Ergebnissen reproduziert werden. Der Kalibrierkurvenverlauf nach 8 h, 30 °C und 700 rpm wird in Abb. 42 (S. 104) gesondert gezeigt, um die Genauigkeit zu demonstrieren, mit der die Boltzmann-Gleichung für sigmoidale Kurvenverläufe diese spezielle Kurve beschreibt ( $R = 0,99874$ ).



**Abb. 42:** Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium der Reihen A-D und F-H nach 8 h mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader (Tecan, Crailsheim) mit der Met-Konzentration im 200 µl Gesamtansatz je well; Spalte 1, 2 = 0 mg/l, 3, 4 = 2 mg/l, 5, 6 = 4 mg/l, 7, 8 = 6 mg/l, 9, 10 = 8 mg/l und 11, 12 = 10 mg/l Met Endkonzentration im Volumen von 200 µl. Inkubation 8 h, 30 °C, 700 rpm mit IKA-Minishaker und 96 well Platten Aufsatz (IKA, Staufen) im Klimaschrank (tritec, Hannover); in Reihe E wurde der zellfreie Überstand von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp unverdünnt vermessen (Daten nicht gezeigt); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.



Um die Optimierung der Aufnahme von Kalibrierkurven voranzutreiben, wurden Vergleichsversuche im Klimaschrank (tritec, Hannover) mit IKA-Minishaker und 96 well Platten Aufsatz (IKA, Staufen) und in einem Thermoshaker (Kisker, Steinfurt) bei einer Temperatur von 35 °C und unterschiedlichen Schüttelfrequenzen durchgeführt (Tab. 14, S. 105). Um eine gesättigte Wasserdampfatosphäre zu schaffen, wurde in den Klimaschrank eine Wasserschüssel mit sehr großer Oberfläche gestellt, um die Verdunstung in den wells der 96 well Platte zu minimieren. Bei dem Thermoshaker handelt es sich um einen von unten und oben beheizbaren Schüttler, der gut isoliert ist und somit bereits durch die Werksherstellung die Verdunstung bei möglichen Inkubationen einschränkt.

**Tab. 14:** Übersicht über die Vermessung der Met-Endkonzentration im well von 1,5 mg/l (eingesetzte Stammlösung 30 mg/l Met) in 96 well Platten mit 2 Versuchsansätzen: 1) Verwendung eines IKA-Minishaker mit 96 well Platten Aufsatz (IKA, Staufen) im Klimaschrank (tritec, Hannover) bei 35 °C mit Wasserschüssel und 2) Einsatz eines PST-60 HL Thermoshakers (Kisker, Steinfurt) bei 35 °C. Die Schüttelfrequenzen und die Inkubationsdauer wurden im Versuchsverlauf variiert.

Extinktion 550 nm [-] im Easy Reader in Abhängigkeit von den Parametern Zeit und Schüttelfrequenz					
Inkubator/Schüttler	Inkubation [h]	400 rpm	700 rpm	900 rpm	1100 rpm
IKA-Minishaker	6	0,08	0,13	0,13	-
Klimaschrank 35 °C	7	0,1	0,13	0,135	-
Endkonzentration im well 1,5 mg/l Met	8	0,12	0,14	0,14	-
5 % einer 30 mg/l Stammlösung					
Thermoshaker 35 °C	6	-	0,125	-	0,13
Endkonzentration im well 1,5 mg/l Met	7	-	0,13	-	0,135
5 % einer 30 mg/l Stammlösung	8	-	0,135	-	0,14

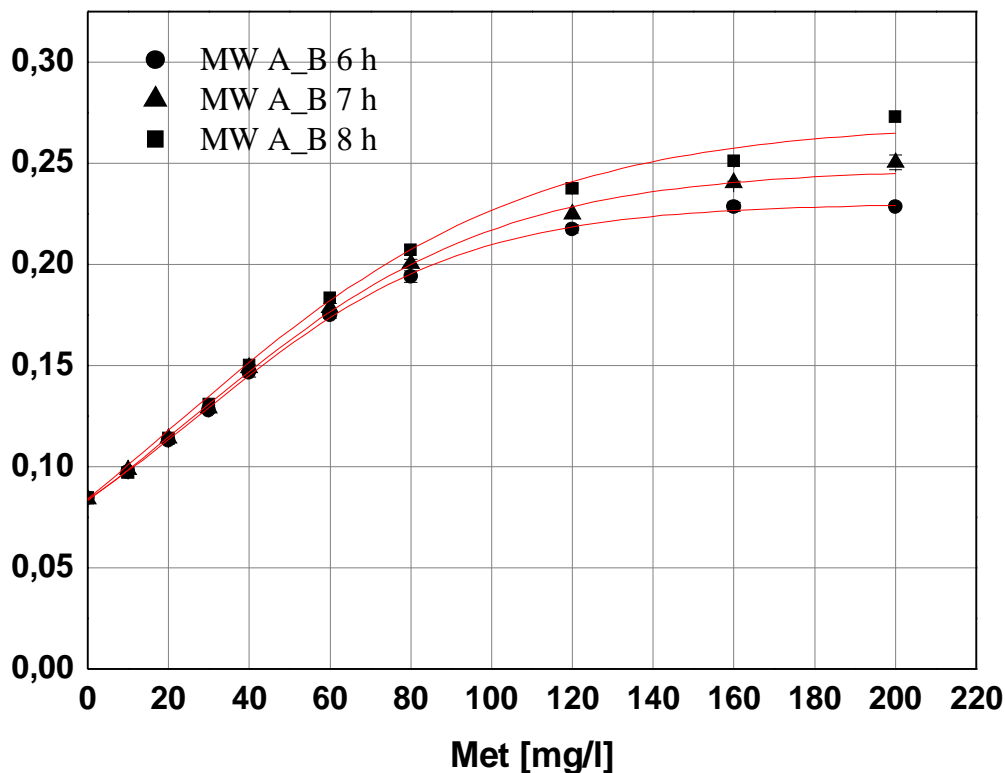
Der Versuchsansatz bestand in der Vermessung von 96 well Platten mit nur einer bestimmten Met-Konzentration (hier 30 mg/l Stammlösung) bei Veränderung der Parameter Inkubator (Klimaschrank mit IKA-Minishaker oder Thermoshaker), Inkubationsdauer und Schüttelfrequenz bei konstanter Temperatur von 35 °C (Tab. 14, S. 105). Die Auswertung erfolgte hinsichtlich der Extinktionsgleichheit aller wells, um möglichst reproduzierbare Ausgangsbedingungen für die Aufnahme von Kalibrierkurven zu schaffen, und in Bezug auf die Wachstumsgeschwindigkeit des *E. coli* B834 bei den gewählten Bedingungen. Die Temperaturerhöhung von 30 °C auf 35 °C brachte einen deutlichen Wachstumsvorteil

gegenüber den vorherigen Versuchen, allerdings ist eine Schüttelfrequenz von nur 400 rpm mit dem IKA-Minishaker zu niedrig. Dies ist zu erkennen an der Zunahme der Extinktion schon nach 6 h bei Erhöhung der Schüttelfrequenz auf 700 rpm; bei 900 rpm ist keine weitere Zunahme zu erkennen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen erscheint die Variante 6 h 35 °C und 700-900 rpm mit dem IKA-Minishaker im Klimaschrank vielversprechend; für eine Met-Konzentration von 30 mg/l wurde eine Extinktion von 0,13 erzielt. Im Klimaschrank war ein Temperaturgradient zu erkennen, der zu leicht erhöhten Extinktionen in den Reihen F-H gegenüber dem Mittelwert der gesamten Platte führte. Bei einer Schüttelfrequenz von mehr als 900 rpm mit dem IKA-Minshaker schwappte bei einer 200 µl Befüllung Flüssigkeit aus den wells; das Gerät ist für diese Art der Anwendung an seiner Leistungsgrenze. Die aus Tab. 15 ersichtliche kontinuierliche Zunahme der Extinktion bei Erhöhung der Schüttelfrequenz zeigt im Vergleich von IKA-Minshaker und Thermoshaker, dass 900 rpm im Thermoshaker noch nicht die Obergrenze der optimalen Schüttelfrequenz darstellt. Eine weitere Erhöhung der Schüttelfrequenz ist nur durch Benutzung eines anderen Gerätes zu erzielen. Beim Arbeiten mit dem Thermoshaker (Kisker, Steinfurt) wurde bereits bei 30 °C Anwendung ein gewisser Temperaturgradient sichtbar. Dieser Effekt konnte durch spiegelverkehrtes Einsetzen der 96 well Platten in den Thermoshaker auf einen berechenbaren Fehler in den Reihen F-H jeder Platte reduziert werden. Bei Vermessung einer 30 mg/l Met-Platte konnte bei der Inkubation von 8 h 30 °C und 700 rpm eine Extinktion<sub>550</sub> im Easy Reader von 0,13 erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Bei einer Temperatur von 35 °C konnte die schon im Klimaschrank beobachtete Verbesserung des Wachstums von *E. coli* B834 erneut beobachtet werden; eine Erhöhung der Schüttelfrequenz von 700 rpm auf 1100 rpm (1200 rpm sind das Gerätemaximum) zeigt in Tab. 15 eine leicht erhöhte End-Extinktion bei allen drei Messzeitpunkten. Nach 6 h 35 °C und 1100 rpm im Thermoshaker ergibt sich für die Vermessung von 30 mg/l Met eine Extinktion<sub>550</sub> im Easy Reader von 0,13. Es ist zu erwarten, dass sich die gewählten Inkubationsbedingungen im Thermoshaker als optimal für die Erstellung von Kalibrierkurven erweisen werden. Die well zu well Unterschiede betragen maximal 0,03 (= 15 mg/l Met); die mittleren Reihen (C-E) sind am besten für die Erstellung von repräsentativen Kalibrierkurven je Platte geeignet; Reihe F-H weisen einen berechenbaren Fehler durch Temperaturgradient auf (leicht erhöhte Extinktion). Da die Verdunstungsverluste im Thermoshaker bei gleichzeitiger Anwendung von Acetatfolien kleiner als im Klimaschrank waren, wurde die Routineanwendung nur noch im Thermoshaker durchgeführt. Es wurden 96 well Platten Kalibrierkurven mit dem 2-Platten-

Thermoshaker (Kisker, Steinfurt) aufgenommen. Die Inkubationsbedingungen waren 6-8 h 35 °C 1100 rpm. Ziel des Versuchs war es, herauszufinden, ob eine Unterscheidung verschiedener Met-Konzentrationen bereits nach 6 oder 7 h möglich ist und wie groß der durch den Temperaturgradienten bedingte Fehler in den Reihen F-H ist. Es wurden 11 Met-Konzentrationen untersucht: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met in H<sub>2</sub>O, d.h. jede Spalte der 96 well Platte beinhaltet eine bestimmte Met-Konzentration, so dass in einer Platte mit 8 Reihen (A-H) 8 reihen-bezogenen Kalibrierkurven entstehen (siehe Anhang Tab. 1-6). Der Versuch wurde im Doppelansatz durchgeführt, Platte A (Tab. 1-3 Abschnitt 9.3.2.a, S. 165-166 Anhang und Abb. 2 Abschnitt 9.3.2.a, S. 163 Anhang) und Platte B (Tab. 4-6 Abschnitt 9.3.2.a, S. 166-167 Anhang und Abb. 3 Abschnitt 9.3.2.a, S. 164 Anhang) mit jeweils 8 einzelnen Kalibrierkurven bzw. 1 Mittelwert-Kalibrierkurve pro Platte und Zeit; die Platten wurden spiegelverkehrt in den 2-Platten-Thermoshaker eingesetzt (Platte A, Position A1 links vorn und Platte B, A1 rechts hinten). Das arithmetische Mittel jeder Spalte bildete die Grundlage für die Erstellung der Mittelwert-Kalibrierkurven (Tab. 15, S. 107) nach 6, 7 und 8 h, welche in Abb. 43 (S.108) dargestellt sind.

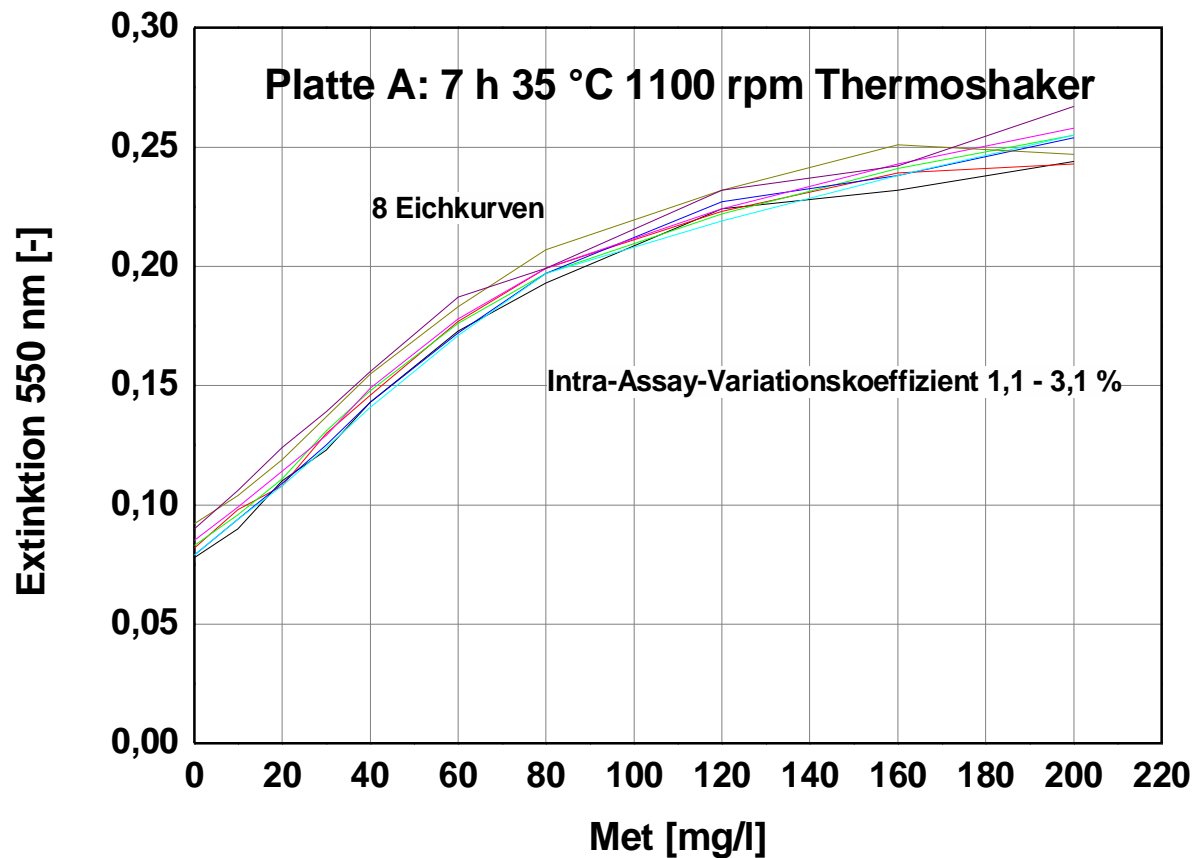
**Tab. 15:** Darstellung der Mittelwerte der Exinktionen im 6, 7 und 8 h Versuch der Aufnahme von Kalibrierkurven in B74-Medium im 2-Platten-Thermoshaker; 6-8 h 35 °C 1100 rpm

<b>Met [mg/l]</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>120</b>	<b>160</b>	<b>200</b>
<b>Spalten</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>A 6 h</b>	0,084	0,097	0,112	0,129	0,145	0,174	0,192	0,216	0,23	0,229
<b>B 6 h</b>	0,085	0,098	0,114	0,132	0,148	0,176	0,196	0,219	0,227	0,228
$\bar{x}$ <b>A_B_6 h</b>	0,085	0,098	0,113	0,131	0,147	0,175	0,194	0,218	0,229	0,229
<b>A 7 h</b>	0,085	0,098	0,113	0,13	0,148	0,177	0,199	0,225	0,241	0,253
<b>B 7 h</b>	0,086	0,099	0,115	0,132	0,15	0,18	0,202	0,225	0,24	0,248
$\bar{x}$ <b>A_B_7 h</b>	0,086	0,099	0,114	0,131	0,149	0,179	0,201	0,225	0,241	0,251
<b>A 8 h</b>	0,085	0,099	0,116	0,133	0,151	0,184	0,207	0,239	0,253	0,275
<b>B 8 h</b>	0,082	0,095	0,112	0,129	0,149	0,183	0,207	0,236	0,249	0,271
$\bar{x}$ <b>A_B_8 h</b>	0,084	0,097	0,114	0,131	0,150	0,184	0,207	0,238	0,251	0,273



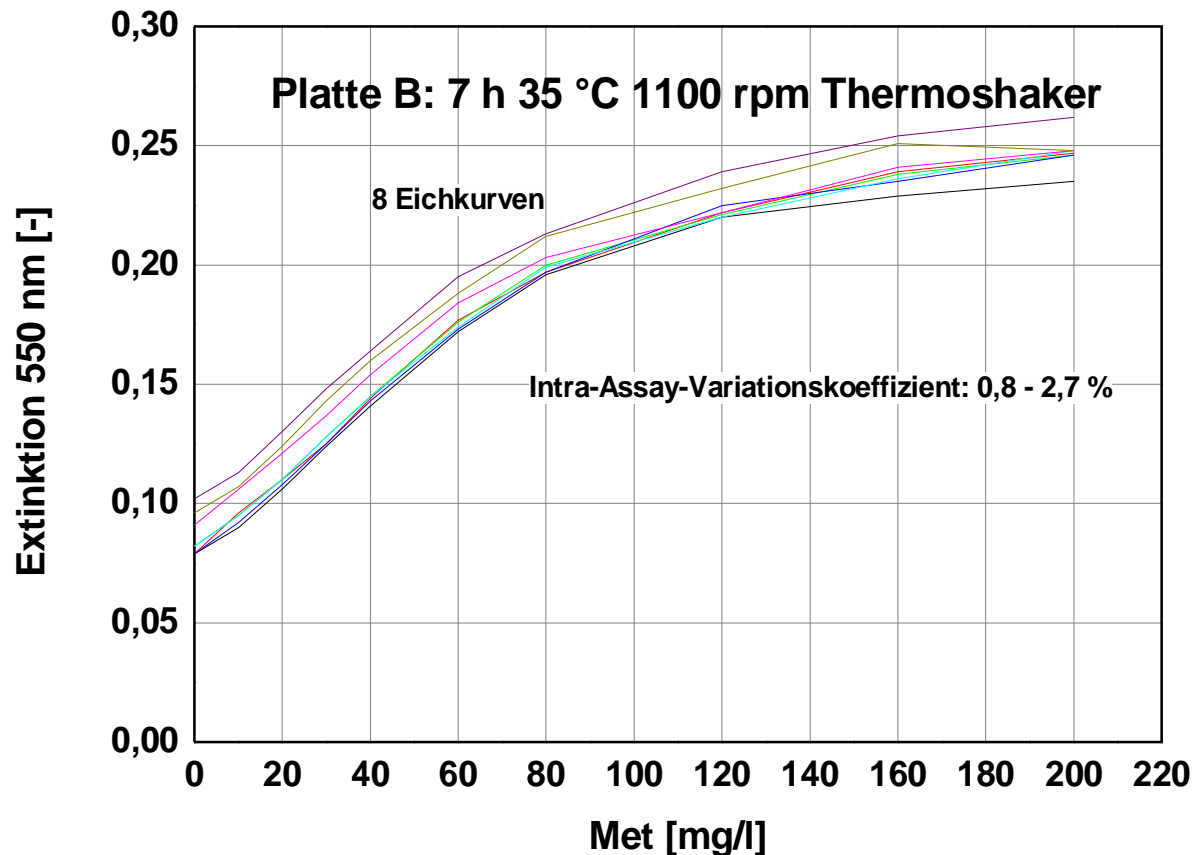
**Abb. 43:** Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium aus Platte A und B nach 6, 7 und 8 h; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 = 1000 mg/l und 12 = 0 mg/l; Met- Endkonzentration in 200 µl beträgt 5 % der Standard-Konzentration. Die Konzentration 1000 mg/l ist in der Abbildung nicht gezeigt. Inkubation 6-8 h 35 °C 1100 rpm im 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt); die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Die Mittelwert-Kalibrierkurven in Platte A und B bieten bereits nach 7 h 35 °C und 1100 rpm die Möglichkeit der Unterscheidung der verschiedenen Met-Konzentrationen. Die Doppelansätze sind nach 6, 7 und 8 h Inkubationsdauer nahezu gleich. Die Versuchsergebnisse der Inkubation von 7 h 35 °C und 1100 rpm wurden in Abb. 44 (S. 109) und 45 (S. 110) in Form reihenweise aufgenommener Kalibrierkurven ausgewertet. Die Reihen F-H beider Platten zeigen um 0,01-0,02 höhere Extinktionen als die anderen Positionen der Platte; dadurch kommt es zu einer Parallelverschiebung der Kalibrierkurven nach oben, je weiter unten in der Platte die Kurve aufgenommen wurde, d.h. Reihe A ist die unterste und Reihe H die oberste Kurve im jeweiligen Diagramm.



**Abb. 44:** Platte A zeigt 8 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven in B74-Medium in 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 7 h 35 °C und 1100 rpm; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 = 1000 mg/l und 12 = 0 mg/l Met. Die Konzentration 1000 mg/l ist in der Abbildung nicht gezeigt. Die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Der Intra-Assay-Variationskoeffizient bezogen auf jede einzelne Met-Konzentration (Werte einer Spalte) streut in Platte A (Abb. 44, S. 109) zwischen min. 1,1 % und max. 3,1 %, in Platte B (Abb. 45, S. 110) zwischen min. 0,8 % und max. 2,7 %. Der Unterschied zwischen Platte A und B ist vernachlässigbar klein, was aus Abb. 44 und 45 hervorgeht. Die Aufnahme paralleler Kalibrierkurven zeigt, dass weder innerhalb einer Platte noch zwischen zwei verschiedenen Platten Extinktionen vorkommen, die die Verlässlichkeit des *E. coli* B834-Tests in Frage stellen könnten.



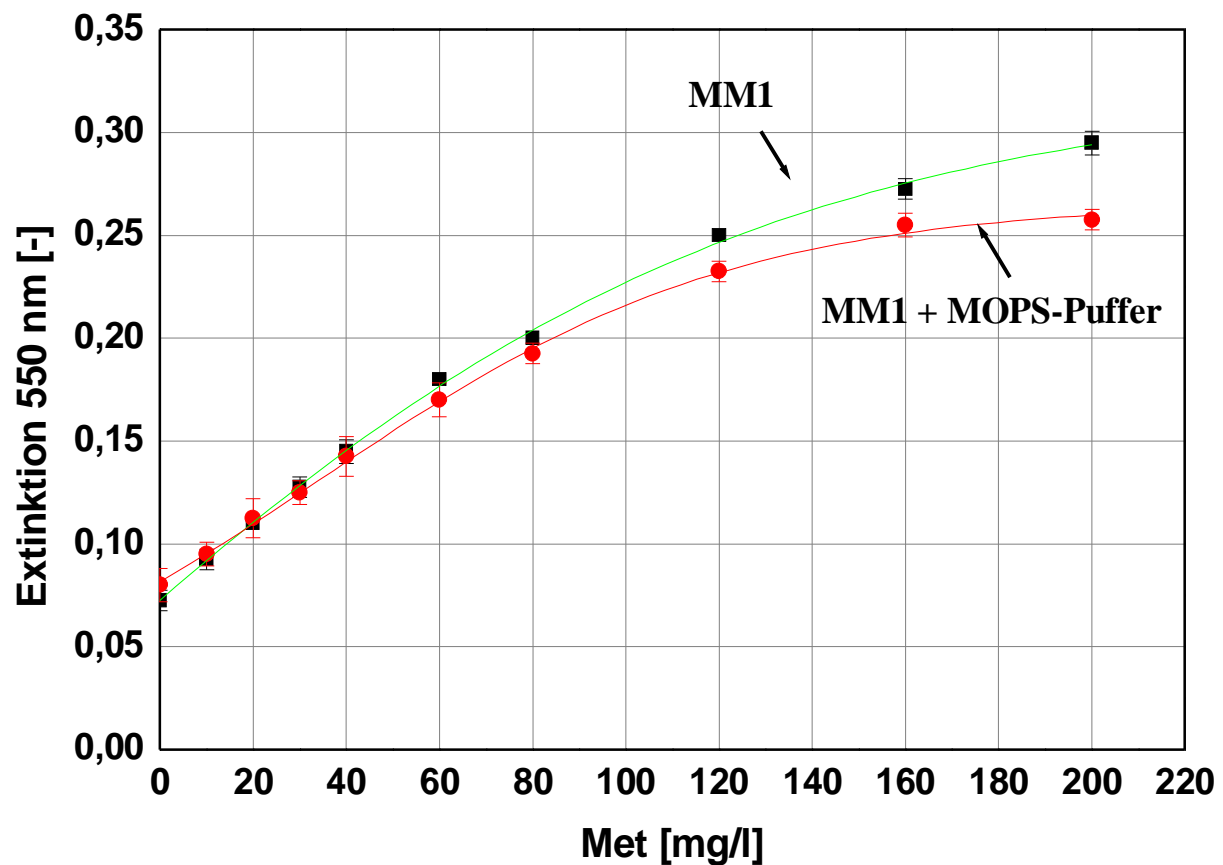
**Abb. 45:** Platte B zeigt 8 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven in B74-Medium im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 7 h 35 °C und 1100 rpm; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 = 1000 mg/l und 12 = 0 mg/l Met. Die Konzentration 1000 mg/l ist in der Abbildung nicht gezeigt. Die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Ab 10 mg/l Met können mögliche Met-Produzenten erkannt werden; sie werden mittels GC überprüft, was zu einer 100%igen Sicherheit führt, ob es sich um „Falsch-Positive“ oder um echte Met-Produzenten handelt. Erfahrungsgemäß sind pro *E. coli*-Test-Platte max. 1-5 „Falsch-Positive“ Kandidaten dabei. Im Konzentrationsbereich kleiner als 10 mg/l ist der Test stark fehlerbehaftet, da sich der Nullwert und der 10 mg/l Met-Wert nur um eine Extinktion<sub>550</sub> von 0,01-0,02 unterscheiden. Da diese Größenordnung als Extinktionsschwankung von well zu well vorkommt, könnte es zu 100 % Fehler kommen bei einer Auswertung im Bereich < 10 mg/l Met. Die Methode 7 h, 35 °C und 1100 rpm im Thermoshaker mit B74 als Grundlage, 5 % *E. coli* B834 Inokulum und 5 % Standard-Zugabe bzw. Proben-Zugabe ist

anwendungsreif für die Mutantenvermessung. Der Wildtyp erzielt nach diesen Inkubationsbedingungen im *E. coli* Test eine Extinktion von 0,09 im Gegensatz zu 0,08 bei der Wasser-Vermessung. 10 mg/l Met in Wasser werden als 0,09 nachgewiesen, d.h. durch den zellfreien Überstand erhöht sich der gesetzte Nullwert von 0,08 auf 0,09, so dass ein zellfreier Überstand erst ab einer Extinktion von 0,10-0,11 als Met-positiver 10 mg/l Met-Kandidat definiert werden kann. Allerdings gilt der hier beschriebene Test nur für Mutanten, die in B74 gewachsen sind und für wässrige Met-haltige Proben. Da sich das B74-Medium aber im Zug der Medienoptimierung als unbrauchbar für die Kultivierung von *C. glutamicum* DSM 20300 und seiner Mutanten herausstellte, mussten Anpassungen des *E. coli* Tests an die neuen Medienvarianten vorgenommen werden.

Es gab eine Medienentwicklung von B74 über MM1 zu MM2. Dadurch mussten auch beim *E. coli* Test Anpassungen vorgenommen werden. Bei Vermessung von *C. glutamicum* zellfreien Überständen kommt es zu einer Einschleppung von Medienkomponenten in den *E. coli* Test. Dies muss bei der Aufnahme von Kalibrierkurven oder Met-Standards berücksichtigt werden. Zunächst werden die Versuche in MM1-Medium vorgestellt. Die Versuche wurden in einer 96 well Platte durchgeführt; in Reihe A-D wurden Kalibrierkurven in MM1 und in Reihe E-H in MM1 unter Zugabe von 5 % MOPS-Puffer aufgenommen (Abb. 4 und 5 siehe Anhang). Wie in B74-Medium sind auch die Kalibrierkurven in MM1-Medium sehr gut geeignet für eine Anwendung zur Vermessung von Organismen auf Met-Bildung, die in MM1-Medium kultiviert wurden bzw. zur Vermessung wässriger Met-Standards. Der Kurvenverlauf in B74-Medium und MM1-Medium ist sehr ähnlich. Die Zugabe von MOPS-Puffer brachte keinen Vorteil gegenüber der Kultivierung in MM1 ohne MOPS-Puffer, die Kurvenverläufe sind nahezu gleich.

In Abb. 46 (S. 112) sind die Mittelwert-Kalibrierkurven in MM1 und in MM1 mit MOPS-Puffer basierend auf den Abbildungen 4 und 5 Abschnitt 9.3.2.b, S. 168 und 169 Anhang dargestellt.



**Abb. 46:** zeigt 2 Mittelwert-Kalibrierkurven in MM1-Medium (Reihe A-D) und in MM1-Medium bei Zugabe von 5 % MOPS-Puffer (400 g/l) (Reihe E-H) im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 7 h 35 °C und 1100 rpm; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 und 12 = 0 mg/l Met. Die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

Eine weitere Medienoptimierung für DSM 20300 führte zum MM2-Medium, in welchem die höchsten Extinktionen im Verlauf von Wachstumskurven erreicht wurden. Wenn Proben, die in MM2 kultiviert wurden, mit Hilfe des *E. coli* Tests auf Met-Bildung vermessen werden sollen, so muss der Test in MM2 anwendbar sein oder zumindest bei Zugabe von 5 % MM2-haltigem zellfreien Kulturüberstand brauchbare Ergebnisse liefern, d.h. der Test muss an das



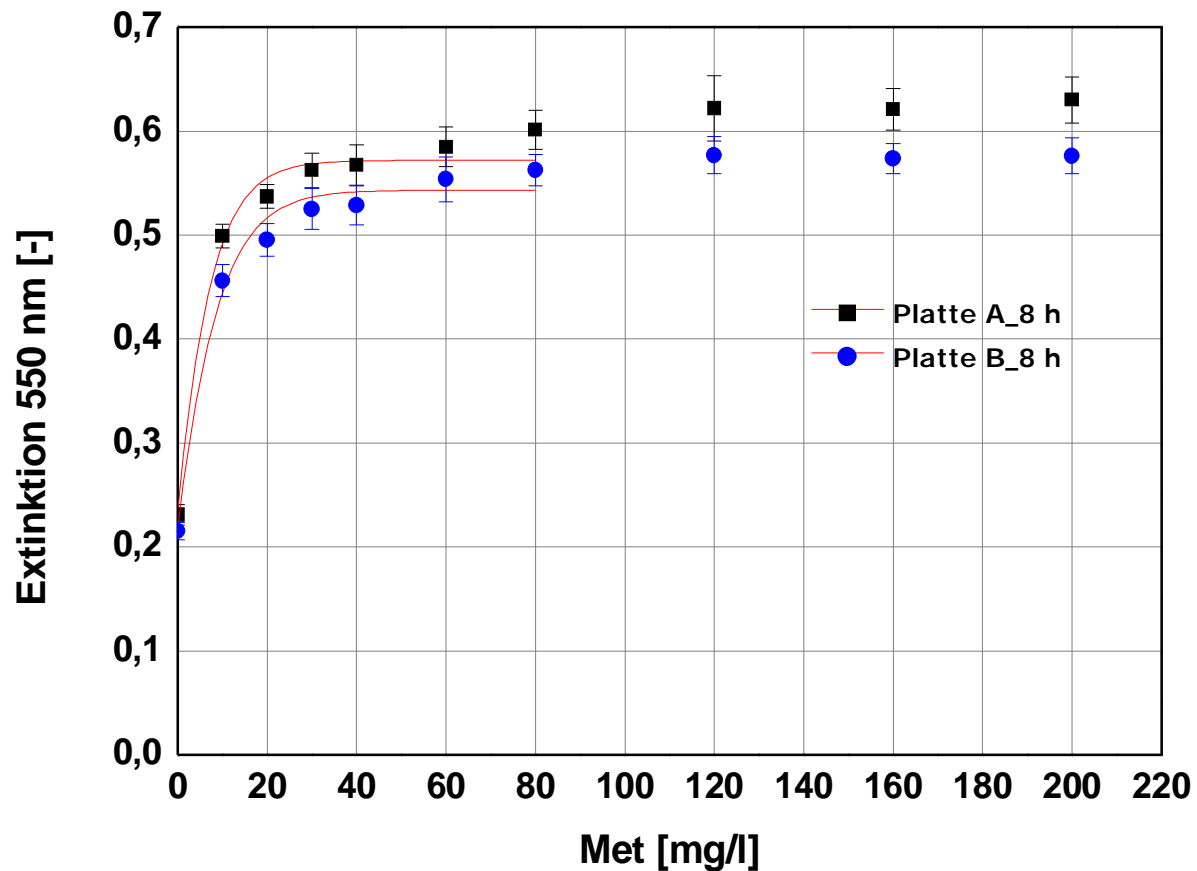
Wachstumsmedium des zu untersuchenden Organismus angepasst werden. Im Anschluss werden die Versuche mit MM2-Medium vorgestellt.

Die Medien B74, MM1 und MM2 zeigen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung. Eine Gemeinsamkeit ist, dass sie eine Eigentrübung aufweisen, was mit der Löslichkeit der enthaltenen Salze in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert zusammenhängt. MM2-Medium zeigt die stärkste Eigentrübung. Für den *E. coli* Test darf das Hintergrundmedium aber so gut wie keine Eigentrübung aufweisen, da sonst die Trübungsmessung in Korrelation mit entsprechenden Met-Konzentrationen gestört ist. Es wurde jeweils eine 96 well Platte mit 190 µl Gemisch aus einem der drei Medien und *E. coli* Inokulum (95 %) und 5 % Wasser pro well hergestellt; die Inkubation erfolgte für 6 h bei 35 °C und 1100 rpm. Die Leerwerte in den drei verschiedenen Medien konnten durch diesen Versuch miteinander verglichen werden, um zu prüfen, wie groß die well zu well Unterschiede in Abhängigkeit vom eingesetzten Medium sind.

**Tab. 16:** Drei Medien beim *E. coli* B834-Test im Vergleich; Leerwerte und maximale well zu well Unterschiede in der Extinktion<sub>550</sub> bei Vorlage von 90 % Medium + 5 % Inokulum + 5 % H<sub>2</sub>O und einer Inkubation von 6 h 35 °C 1100 rpm

Medium	Zusätze	Mittelwert-Extinktion <sub>550</sub> 6 h 35 °C 1100 rpm	max. well zu well Extinktionsunterschiede
B74	5 % <i>E. coli</i> B834-Inokulum	0,08	< 0,01
MM1		0,07	bis zu 0,02
MM2	5 % H <sub>2</sub> O	0,10-0,12	bis zu 0,05

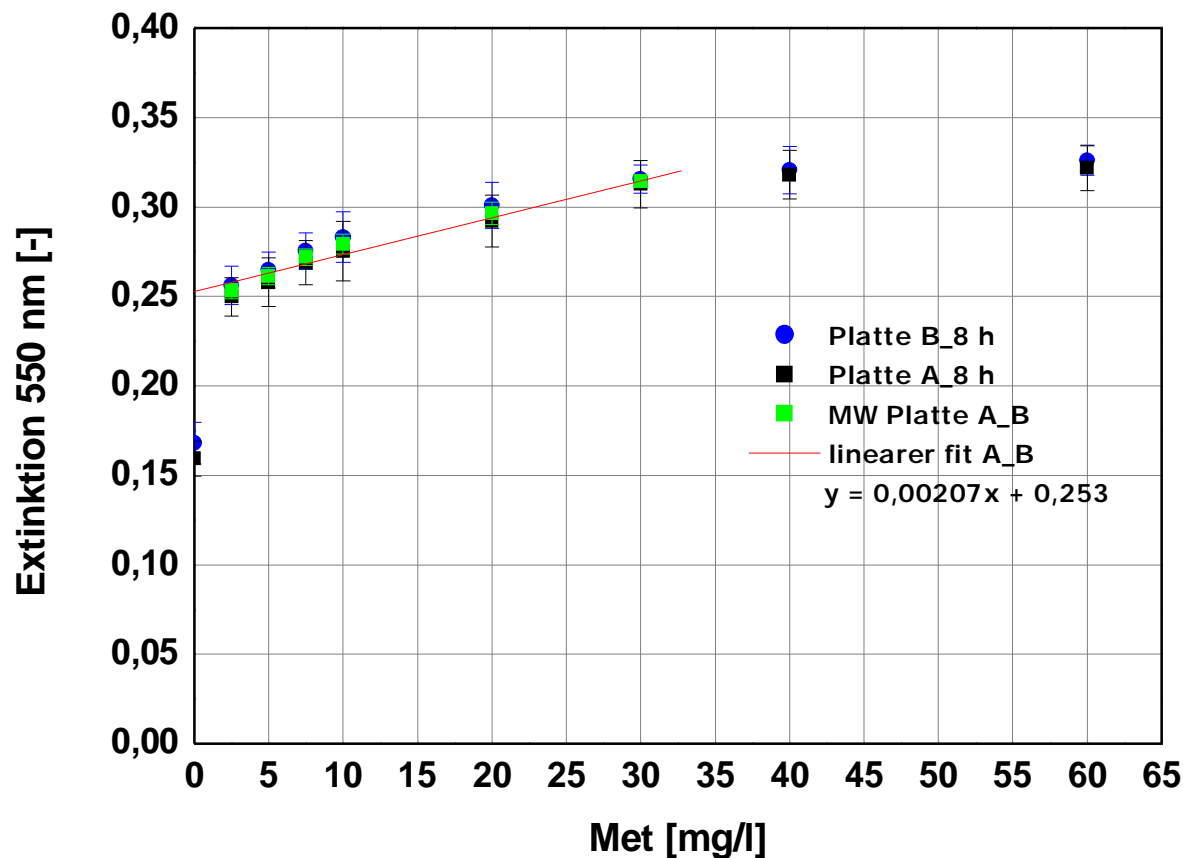
Aus Tab. 16 (S. 113) wird klar ersichtlich, dass B74 und MM1 sehr gut als Hintergrundmedien für den *E. coli* Test einzusetzen sind; die well zu well Unterschiede sind vernachlässigbar klein; dies konnte durch Aufnahme von Kalibrierkurven gezeigt werden. Aber bei Einsatz von MM2 Medium wurden Extinktionsunterschiede von bis zu 0,05 von well zu well sichtbar. Damit erscheint es schwierig, reines MM2-Medium als Hintergrundmedium für die Erstellung von Kalibrierkurven im *E. coli* Test einzusetzen. Es wurden Kalibrierkurven im Mehrfachansatz in MM2 als Hintergrundmedium (90 %) bei Zugabe von 5 % Inokulum und 5 % Met-Standard in Wasser hergestellt (Abb. 47, S. 114).



**Abb. 47:** Versuch 1 zeigt 2 Mittelwert-Kalibrierkurven in MM2-Medium (Platte A und B) im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 8 h 35 °C und 1100 rpm; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 und 12 = 0 mg/l Met. Die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet; jeder Mittelwert wurden aus 8 Einzelwerten je Spalte der 96 well Platte gebildet.

Der Versuch lief in beiden Platten gleich ab, es liegt nur eine geringe Parallelverschiebung der Extinktionsmittelwert-Kurven vor (Abb. 47, S. 114). Es ist auffällig, dass es einen Extinktionssprung von 0 zu 10 mg/l Met gibt, danach werden die Unterschiede von Konzentration zu Konzentration geringer. Nur im Bereich bis 30 mg/l sind nach 8 h Inkubation deutliche Unterschiede vorhanden. Dargestellt sind nur die MW-Kurven beider Platten nach 8 h; nach 6 und 7 h waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Met-Konzentrationen noch viel geringer als nach 8 h, auch im Bereich bis 30 mg/l Met waren kaum Unterschiede zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Man erkennt, dass sich die Kurve asymptotisch einer gedachten Parallele zur Abszisse bei einer Extinktion<sub>550</sub> von etwa 0,6

annähert. Allerdings ergibt der sigmoidale fit nach Boltzmann bei der Kalibrierkurve in MM2\_2-Medium (Abb. 47, S. 114) keine gute Übereinstimmung mit dem tatsächlichen Kurvenverlauf wie es gemäß Aufnahme von Kalibrierkurven in B74 und MM1 zu erwarten war. In einem weiteren Versuch sollte der Konzentrationsbereich zwischen 0-10 mg/l Met finer abgestuft vermessen werden, um folgende Hypothese zu prüfen: Es könnte sein, dass sich durch Einsatz des MM2-Mediums die Sensitivität des *E. coli* Tests in Bezug auf Met erhöht hat (Abb. 48, S. 115).



**Abb. 48:** Versuch 2 zeigt 2 Mittelwert-Kalibrierungen in MM2-Medium (Platte A und B) im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 8 h 35 °C und 1100 rpm; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 2,5 mg/l, 3 = 5 mg/l, 4 = 7,5 mg/l, 5 = 10 mg/l, 6 = 20 mg/l, 7 = 30 mg/l, 8 = 40 mg/l, 9 = 60 mg/l Met. Jeder Extinktionsmittelwert wurde aus 8 Einzelwerten je Spalte der 96 well Platte gebildet. Der Bereich 2,5-30 mg/l Met wurde als lineare Regressionsgerade dargestellt.

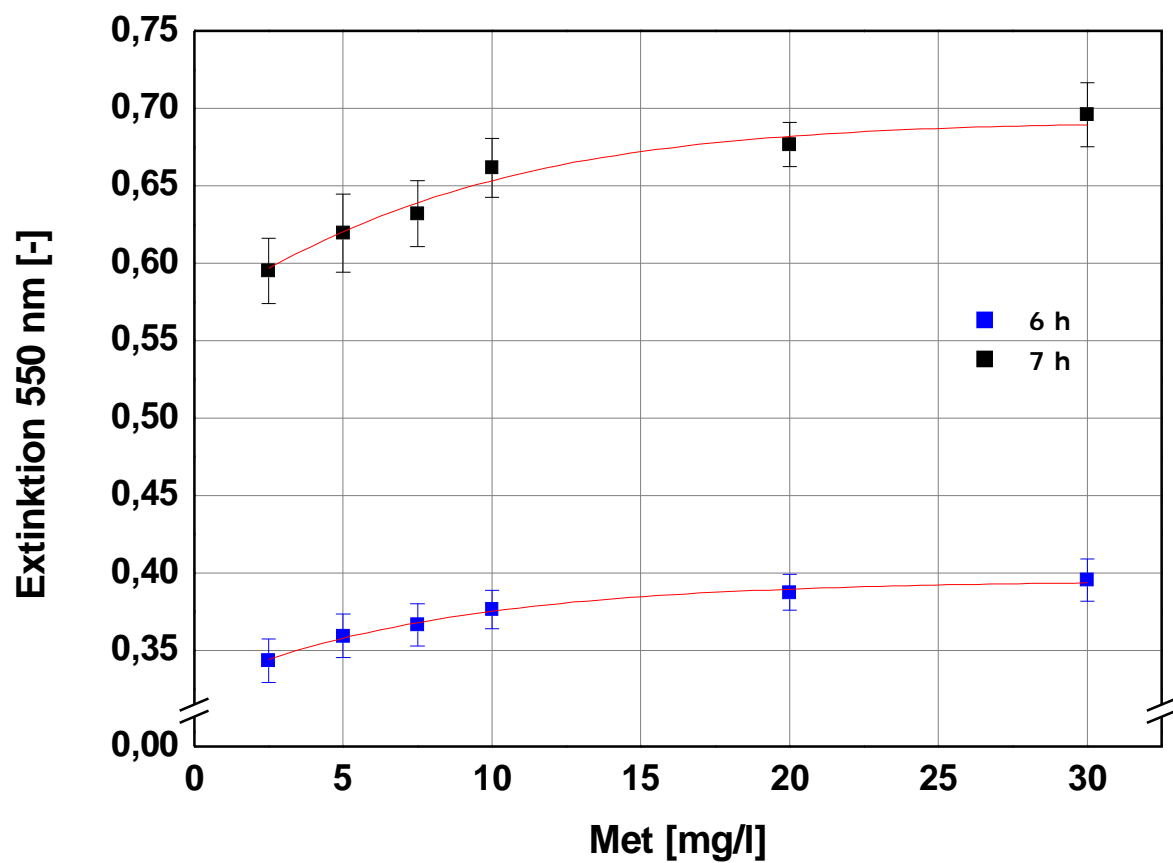
Die Abb. 48 lässt vermuten, dass der *E. coli* Test in MM2-Medium gut geeignet ist, um sogar geringe Konzentrationsunterschiede von Met in einer zu vermessenden Probe zu erfassen, da mit Zunahme der Met-Konzentration auch die Extinktion steigt. Der Bereich von 2,5-30 mg/l

Met wurde in Form einer linearen Regression dargestellt. Mit Hilfe der Regressionsgerade ist es möglich, Met-Konzentrationen unbekannter Lösungen nach Extinktionsmessung im Bereich 2,5 – 30 mg/l Met zu berechnen. Es ist zwar richtig, dass der *E. coli* Test in der 3. Nachkommastelle der Extinktion eine Unterscheidung von Met-Konzentrationen von sogar < 10 mg/l bei Betrachtung von Mittelwerten einer 96 well Platte ermöglicht, aber durch die bereits erwähnte problematische Eigentrübung des MM2-Mediums sind die dadurch bedingten well-zu-well-Unterschiede im *E. coli* Test deutlich größer als die feinen durch die Met-Konzentration bedingten Unterschiede der Extinktion im Bereich 0-10 mg/l. Der *E. coli* Test besitzt in dieser Form bei Einsatz von MM2-Medium keine ausreichende Verlässlichkeit für eine Routineanwendung in einem Screening nach Met-Überproduzenten. Für eine Ja/Nein-Entscheidung, ob Met in einer Lösung vorliegt oder nicht, ist die Methode in MM2-Medium dagegen bestens geeignet. Obwohl in beiden Versuch (Abb. 47, S. 114 und Abb. 48, S. 115) die gleichen Inkubationsbedingungen durchgeführt wurden, ist die End-Extinktion in Versuch 1 bei 0,6 und die in Versuch 2 bei etwas über 0,3 erreicht. Solche Unterschiede lassen sich durch Altersunterschiede des *E. coli* Inokulums erklären. Ein ganz frisch hergestelltes Inokulum wird immer ein schnelleres und besseres Wachstum ermöglichen als ein exakt 4 Wochen bei 4 °C gelagertes Inokulum. Da aber bei jedem Test Positiv- und Negativkontrollen für den Vergleich der Extinktionen mitgeführt werden, stellt dies keinen Nachteil für das Testsystem dar. Ein weiterführender Versuchsansatz zur Optimierung der Prozedur mit MM2-Medium war die Verwendung von MM1-Medium als Hintergrund für den Test mit einer Zugabe von 5 % Inokulum und 5 % Met-Standards, die in MM2-Medium hergestellt wurden (Tab. 17, S. 116).

**Tab. 17:** *E. coli* Test mit 90 % MM1 + 5 % Inokulum + 5 % Met-Standard in MM2; Extinktionsmessung Easy Reader<sub>550</sub> nach 6 und 7 h 35 °C 1100 rpm; 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10, 20, 30 mg/l Methionin (Spalte 2-7 einer 96 well Platte) in MM2 hergestellt. Jeder Wert ist der Mittelwert aus 8 Einzelextinktionen je Spalte.

Met [mg/l]	Extinktion 550 nm [-] nach 6 h	Extinktion 550 nm [-] nach 7 h
0,0	0,12	0,16
2,5	0,34	0,60
5,0	0,36	0,62
7,5	0,37	0,63
10,0	0,38	0,66
20,0	0,39	0,68
30,0	0,40	0,70

Auch in der Reproduzierung dieses Versuchs entsprach bei den Extinktionsmittelwerten für eine Met-Konzentration ein Extinktionsunterschied von 0,01 dem Sprung von einer zur nächsten Met-Konzentration (z.B. von 2,5 auf 5 mg/l oder von 5 auf 7,5 mg/l; Werte-Tabelle nicht gezeigt). Der Wildtyp wurde bei gleicher Methode nach 6 h mit einer Extinktion von 0,08 als 0 mg/l Met nachgewiesen, d.h. eine gute Voraussetzung zur Unterscheidung des Wildtyps DSM 20300 von möglichen Met-überproduzierenden Mutanten. Es handelte sich um eine Platte, in der 3 Reihen (36 wells) mit dem zellfreien Überstand des Wildtyps versetzt waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Basierend auf Tab. 17 (S. 116) werden in Abb. 49 (S. 117) die Mittelwert-Kalibrierkurven in 90 % MM1-Hintergrund mit 5 % MM2-Met-Standards gezeigt.



**Abb. 49:** zeigt 2 Mittelwert-Kalibrierkurven in MM1-Medium einer Platte zu zwei Messzeitpunkten im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 6 und 7 h 35 °C und 1100 rpm; Konzentration der eingesetzten Met-Standards in 2,5, 5,0, 7,5, 10, 20, 30 mg/l Met. (Spalte 2-7 einer 96 well Platte) in MM2-Medium hergestellt. Jeder Wert ist der Mittelwert aus 8 Einzelextinktionen je Spalte.

Die Steigung ist nach 6 und 7 h nahezu identisch, d.h. es macht in diesem Beispiel keinen Unterschied für die Qualität des *E. coli* Tests, ob er nach 6 oder nach 7 h gestoppt und ausgewertet wird. Die in Abb. 49, S. 117 gezeigte Methode würde aber nur ohne jegliche Störung funktionieren, d.h. ohne well zu well Unterschiede durch z.B. Medientrübung oder durch *E. coli* Inokulum-Qualitätsunterschiede. Dies führte zwar bei Aufnahme von Kalibrierkurven in B74-Medium und MM1-Medium mit wässrigen Met-Standards nicht zu Problemen, aber im Fall der Zugabe von MM2-Standards würden schon geringe Fehler ausreichen, um eine falsche Met-Konzentration nachzuweisen. Aus den Versuchen bei Zugabe von Met-Standards, die in MM2-Medium hergestellt wurden, ist zu erkennen, dass selbst ein kleines Volumen von nur 5 %iger Zugabe an MM2 ausreicht, um beim *E. coli* einen Wachstumsschub auszulösen (siehe Tab. 17, S. 116), der unabhängig von der vorhandenen Met-Konzentration zu verlaufen scheint. Bei Vermessung von Wasser ergeben sich Extinktionen von ca. 0,08 (Daten nicht gezeigt), bei Zugabe von 5 % MM2 Extinktionen von etwa 0,12 nach 6 h und 0,16 nach 7 h. Es könnte sich um eine Art Restwachstum des ausgehungerten *E. coli* Inokulums bei Zugabe von MM2 handeln.

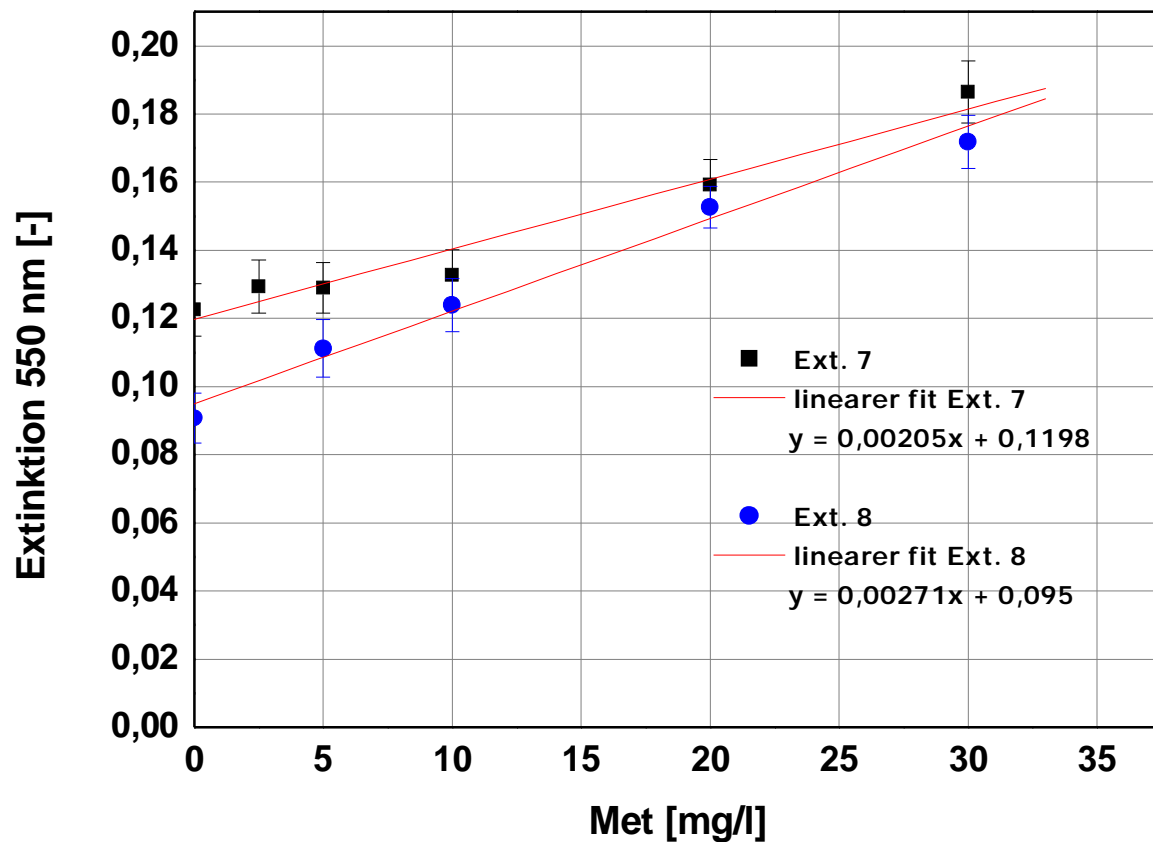
Es stellte sich die Frage, wie der *E. coli* in seinem Wachstumsverhalten reagiert, wenn ihm 90 % B74 als Grundlage, 5 % Inokulum und 5 % Met-Standard, das in „verbrauchtem“ MM2-Medium hergestellt wurde, als Nährmedium geboten werden. Mit verbrauchtem MM2 ist zellfreier Überstand einer Kultivierung von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp in MM2 bis zur späten exponentiellen Phase gemeint (z.B. bis zu einer Extinktion<sub>600</sub> von 7). Eine Einschleppung von freiem Met kann auf diesem Weg nicht erfolgen, da der Wildtyp DSM 20300 nicht zu einer vermehrten Met-Ausschüttung ins Kulturmedium in der Lage ist. Es entstanden Kalibrierkurven, die nahezu identisch sind mit solchen, die mittels Zugabe von wässrigen Met-Standards in MM1 als Hintergrundmedium erzeugt wurden.

Es wurden Kalibrierkurven mit Met-Standards in zellfreiem Überstand mit der Extinktion<sub>600</sub> von 7,0 und 8,0 erstellt und nach 6 h mit dem Easy Reader vermessen; die Ergebnisse sind in Tab. 18, S. 119 und Abb. 50 (S. 120) dargestellt.

**Tab. 18:** *E. coli* Test mit 90 % B74 + 5 % *E. coli* Inokulum + 5 % Met-Standard in verbrauchtem MM2-Medium (Extinktion<sub>600</sub> von 7 und 8); Extinktionsmessung Easy Reader<sub>550</sub> (Tecan, Crailsheim) nach 6 h 35 °C 1100 rpm Thermoshaker; 0 = Zugabe des zellfreien Überstandes mit einer Extinktion von 7; 2,5, 5, 10, 20, 30 mg/l Methionin (2 Spalten einer 96 well Platte je Konzentration) in MM2-Medium hergestellt. Jeder Wert ist der Mittelwert aus 16 Einzelextinktionen.

Met [mg/l] in zellfreiem Überstand Extinktion <sub>600</sub> von 7		Extinktion 550 nm	Met [mg/l] in zellfreiem Überstand Extinktion <sub>600</sub> von 8		Extinktion 550 nm
0,0		0,120	0,0		0,090
2,5		0,125	5,0		0,110
5,0		0,126	10,0		0,120
10,0		0,127	20,0		0,150
20,0		0,155	30,0		0,170
30,0		0,180	H <sub>2</sub> O		0,080

Im Bereich 0-10 mg/l sind die Extinktionsunterschiede bei Einsatz von zellfreiem Überstand einer Extinktion von 7 als Hintergrund nur in der 3. Nachkommastelle sichtbar, zwischen 10 und 20 mg/l und auch zwischen 20 und 30 mg/l Met gibt es einen Extinktionssprung, der zu Unterschieden in der 2. Nachkommastelle der Extinktion bei 550 nm führt. Bei Nutzung des zellfreien Überstandes einer Extinktion<sub>600</sub> von 8 gibt es im Bereich 0-10 mg/l und auch zwischen 10-30 mg/l Met Extinktionsunterschiede in der 2. Nachkommastelle, wobei die Unterschiede zwischen 10-30 mg/l größer sind als im Bereich der Abstufungen zwischen 0-10 mg/l.



**Abb. 50:** Regressionsgerade durch die Extinktionsmittelwerte im Bereich 0 – 30 mg/l Met in 90 % B74 + 5 % *E. coli* Inokulum + 5 % Met-Standard in verbrauchtem MM2-Medium bei einer **Extinktion<sub>600</sub> von 7 und 8**; Inkubation 6 h 35 °C 1100 rpm. Jeder Mittelwert wurde aus 16 Einzelextinktionen gebildet.

Obwohl es sich bei den Extinktionen der Tab. 18 (S. 119) um Extinktionsmittelwerte von jeweils 16 Einzelextinktionen (2 Spalten einer 96 well Platte pro Met-Konzentration) handelt, liegen die Punkte verstreut um die Regressionsgerade in Abb. 50 (S. 120). Die Extinktion des verbrauchten MM2-Mediums, das für die Met-Standards verwendet wurde, hat Einfluss auf die Steigung der Kalibriergeraden in Abb. 50. Bei Extinktion 8,0 ist die Start-Extinktion bei 0 mg/l Met mit 0,09 zwar geringer als bei der Extinktion 7,0 mit 0,12, aber die Steigung der Regressionsgeraden (Abb. 50, S. 120) ist größer. Die Konzentration 2,5 mg/l Met wurde in dem Versuchsansatz mit einer Ausgangsextinktion von 8,0 nicht untersucht, da anhand der Ergebnisse des Versuchs mit der Ausgangsextinktion 7,0 klar ersichtlich war, dass es keine großen Extinktionsunterschiede zwischen 2,5 und 5 mg/l Met geben würde. Es fällt auf, dass die ursprünglich im MM2-Medium gewachsene Extinktion im verbrauchten MM2 großen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit vom *E. coli* mit zusätzlichem Met hat. Eine



Extinktion von 7,0 gegen Ende der exponentiellen Phase von DSM 20300 Wildtyp zeigt Werte ähnlich der Kalibrierkurven mit B74 und wässrigen Met-Standards; bei einer Extinktion von 8,0 als Untergrund für die Herstellung der Met-Standards (Abb. 50, S. 120 und Tab. 18, S. 119) wächst der *E. coli* noch schneller; es könnte aber sein, dass schon Zell-Lyse eingesetzt hat, so dass der *E. coli* mehr als nur minimale Medienbestandteile und zugesetztes Met zur Verfügung hat. Dieser Umstand führt dazu, dass der Test nicht reproduzierbar ist. Es ist nicht möglich, einen generell gut geeigneten zellfreien Überstand in MM2 herzustellen, der für die Herstellung der Met-Standards eingesetzt werden könnte, da die gescreenten Mutanten eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit haben. Die Herstellung der Kalibrierkurve soll aber die echten Testbedingungen simulieren. Die Zugabe von 5 % zellfreiem Überstand der Mutanten und die Behandlung der Met-Standards muss im Optimalfall gleich erfolgen. Wenn 85 % Untergrundmedium B74 mit 5 % Inokulum und 5 % unverbrauchtem MM2-Medium vereint werden und anschließend alternativ 5 % Met-Standard in Wasser oder 5 % zu vermessender zellfreier Überstand eingesetzt werden, wäre diese Voraussetzung erfüllt. Diese Versuchsanordnung kann aber nur dann eine Optimierung des bestehenden Tests darstellen, wenn die Zugabe von mehr als 5 % unverbrauchtem MM2-Medium keinen Vorteil beim *E. coli* bringt gegenüber der Zugabe von exakt 5 % unverbrauchtem MM2. Dieser Test wurde durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt); es wurde festgestellt, dass in der kurzen Inkubationsdauer von 6-8 h 35 °C 1100 rpm *E. coli* bei 5 % und bei 10 % Zugabe von MM2-Medium gleich gut und gleich schnell wächst, damit sind die Voraussetzungen für eine Test-Optimierung erfüllt. Nachdem festgestellt wurde, dass die Aufnahme repräsentativer Kalibrierkurven in MM2-Medium aus schon genannten Gründen nicht möglich ist, war ein neu definiertes Ziel in der Entwicklung eines schnellen und kostengünstigen Met-Nachweissystems, die Extinktionsschwelle zwischen 0 und z.B. 5 mg/l Met ausnutzen zu können für die Entwicklung eines Ja/Nein-Tests auf Met-Überproduktion gegenüber dem Wildtyp *C. glutamicum* DSM 20300. Diese Überlegung wurde in nachfolgendem Versuch geprüft (Tab. 19, S. 122).

**Tab. 19:** Schematische Darstellung einer 96 well Platte: In jedes well 190 µl eines Gemisches aus 85 % B74 – 10 % H<sub>2</sub>O, 5 % *E. coli* Inokulum und 5 % MM2. In Reihe A-D wurden 4 reihenweise Kalibrierkurven aufgenommen durch Zugabe von 5 % Met-Standards der Konzentration 0, 2,5, 5, 10, 20 und 30 mg/l Met in H<sub>2</sub>O; es wurden 2 Spalten für eine Met-Konzentration eingesetzt. In Reihe E-H wurde durch Zugabe von 5 % der Wildtyp zellfrei mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 7 vermessen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,16	0,17	0,36	0,37	0,38	0,38	0,40	0,40	0,41	0,41	0,44	0,42
B	0,17	0,18	0,37	0,37	0,39	0,41	0,43	0,43	0,43	0,42	0,40	0,41
C	0,18	0,19	0,39	0,38	0,41	0,42	0,45	0,48	0,45	0,43	0,41	0,42
D	0,18	0,18	0,38	0,38	0,42	0,40	0,44	0,47	0,45	0,44	0,43	0,43
E	0,20	0,21	0,20	0,19	0,20	0,20	0,19	0,20	0,19	0,19	0,18	0,16
F	0,21	0,22	0,22	0,20	0,21	0,21	0,20	0,21	0,20	0,21	0,20	0,20
G	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21	0,21	0,20
H	0,24	0,23	0,21	0,21	0,21	0,22	0,23	0,21	0,22	0,21	0,21	0,21

Eine Kalibrierkurve ist mit Zugabe von MM2 in B74 nicht zu verwirklichen. Die Konzentrationen 10-30 mg/l sind schon nicht mehr voneinander zu unterscheiden. 2,5, 5 und 10 mg/l lassen sich noch deutlich voneinander unterscheiden. Der Extinktionssprung von 0 auf z.B. 2,5 oder 5 mg/l Met konnte in diesem Versuch reproduziert werden. Diese Schwelle kann ausgenutzt werden, um eine Vorselektion von Met-überproduzierenden Mutanten zu ermöglichen. Tab. 20 (S. 123) gibt eine Übersicht über die Mittelwert-Extinktionen der Versuchsanordnung aus Tab. 19 (S. 122). Die Vermessung des zellfreien Überstands einer Kultivierung des Wildtyps DSM 20300 in MM2-Medium mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 7,0 (Reihe E-H, Tab. 19, S. 122) zeigte Messwerte von 0,16 – 0,24. Obwohl diese Werte noch etwas über dem Wert der Vermessung von Wasser liegen, sind sie eindeutig dem Nullwert (0 mg/l Met) zuzuordnen, da die Extinktion bei der ersten Met-Konzentration von etwa 2,5 mg/l im Mittel bei 0,37 liegt.

**Tab. 20:** Übersicht über die Mittelwert-Extinktionen des Versuchs aus Tab. 19

Spalte	Met [mg/l]	MW-Extinktion 550 nm [-]
		Reihe A-D
1, 2	<b>0</b>	<b>0,18</b>
3, 4	2,5	0,38
5, 6	<b>5</b>	<b>0,40</b>
7, 8	10	0,44
9, 10	20	0,44
11, 12	30	0,42

Die Schwelle von 0 mg/l mit einer Extinktion<sub>550</sub> von 0,2 zu 5 mg/l Met mit einer Extinktion<sub>550</sub> von 0,4 ist groß genug für eine schnelle und erfolgversprechende Screeningprozedur nach Met-Produzenten. Da die Unterscheidung in der ersten Nachkommastelle der Extinktionen erfolgt, sind die Hintergrundfehler durch MM2-Eigentrübung und Inokulum-Qualitätsunterschiede von bis zu 0,05 kleiner als der Unterschied in der Extinktion zwischen 0 und 5 mg/l Met. Weiterhin könnten bei Automatisierung dieses Vorgangs Fehler durch die MM2\_2-Eigentrübung minimiert oder sogar komplett ausgeschlossen werden, wenn ein Roboter z.B. entweder direkt vor Entnahme von MM2\_2 das Medium gut durchmischt, so dass Schwebstoffe homogen verteilt sind, oder konsequent aus einer bestimmten Schichttiefe Medium entnimmt, was bei konstanter Temperatur überall den gleichen Eigentrübungsgrad aufweisen würde.

### **5.3.2.b Kultivierung von *C. glutamicum* DSM 20300 Mutanten in MM2\_2 im 96 well Maßstab**

Die im Kolbenversuch erzielten Wachstumsraten des Wildtyps von DSM 20300 in MM2\_2 sollten im 96 well Maßstab reproduziert werden, um die Wachstumsparameter für eine Mutantenkultivierung einsetzen zu können (Tab. 21, S. 124). Es sollten End-Extinktionen<sub>600</sub> von 5-8 gegen Ende der exponentiellen Phase erzielt werden, um die Chance zu erhöhen, gebildetes Met im *E. coli* Test oder per GC sichtbar machen zu können (Abschnitt 5.1.4, S. 68). Die Medienentwicklung und die Entwicklungsschritte zu einer optimalen Schüttelkolbeninkubation sind bereits in Abschnitt 5.1 (S. 53ff.) erörtert worden. Die Extinktion sollte unter 8,0 sein, da ansonsten Zell-Lyse den *E. coli* Test im Met-Nachweis

stört. Das Wachstum im 96 well Maßstab wurde am Wildtyp DSM 20300 entwickelt. Dazu wurden Einzelkolonien von DSM 20300 auf 53er Platte hergestellt und als Animpfmateriel für Wachstumsversuche in MM2\_2-Medium eingesetzt. Mit Hilfe eines sterilen Holzzahnstochers wurde jeweils 1 EK pro well ins vorgelegte Medium eingerieben. Eine Schüttelfrequenz von 1100 rpm im Thermoshaker (Kisker, Steinfurt) war für die homogene Verteilung der EK und des im Verlauf der Inkubation wachsenden Zellmaterials erforderlich. Bei der Kultivierung von DSM 20300 im 96 well Maßstab sollte keine Acetatfolie zum Verkleben der Oberfläche benutzt werden, da der Sauerstoffaustausch dadurch eingeschränkt ist. Wachstumsversuche bei Einsatz von 96 well Platten mit Folie und Deckel im Vergleich zu Platten ohne Folie und mit Deckel zeigten leicht erhöhte Extinktionen in den Platten ohne Folie (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 21:** Wachstumsversuch von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp in MM2\_2-Medium. Die Inkubation erfolgte im 96 well Maßstab, Thermoshaker (Kisker, Steinfurt) bei einer Schüttelfrequenz von 1100 rpm. 200 µl MM2\_2 pro well wurden mit sterilem Holzzahnstocher mit einer DSM 20300 Einzelkolonie von 53er Platte angeimpft. Die Extinktionen<sub>550</sub> der Spalte 3 sind aus jeweils 24 Einzelextinktionen einer 96 well Platte zusammengesetzt.

Temperatur [°C]	Inkubationsdauer [h]	Extinktion 550 nm
27	16	ca. 10
30	6	2-3
30	8	2-8
30	18	ca. 10

Bei einer länger andauernden Inkubation von 16 und 18 h bei 27 und 30 °C befindet sich die Kultur bereits in der Stationärphase mit einer Extinktion<sub>550</sub> von ca. 10,0. 6 und 8 h 30 °C sind mit einer Extinktion von 2-3 bzw. 2-8 nahe am gewünschten Bereich der exponentiellen Phase. Um eine Extinktion<sub>550</sub> von 5-8 zu erzielen, sollte die Kultivierung in Anlehnung an die Ergebnisse aus der Tab. 28 im Bereich 7-8 h bei 30-32 °C oder 16 h bei einer Temperatur <27 °C durchgeführt werden. Obwohl die Kultivierungsparameter für den Wildtyp DSM 20300 entwickelt wurden, sind die Extinktionsergebnisse nicht immer gleich. Die Einzelkoloniegröße beim Animpfen spielt eine große Rolle für die Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur. Bei Mutanten ist es noch etwas schwieriger, eine Standardinkubation zu finden, die für alle Mutanten Gültigkeit besitzt und allen Mutanten

gleichmäßig zu gutem Wachstum im Bereich Extinktion<sub>550</sub> von 5-8 verhelfen. Da die Mutanten-EK nach der Mutation und der 48 h Inkubation auf 53er Platte aber zum einen nicht alle die gleiche Größe haben und zum anderen eine z. T. sehr unterschiedlich Wachstumsgeschwindigkeit haben, kann die hier entwickelte Prozedur für optimales Wachstum im Bereich der exponentiellen Phase nur einen Kompromiss zwischen den Erfahrungen am Wildtyp und den Erfahrungen zahlreicher Mutanten-Kultivierungen im 96 well Maßstab und MM2\_2-Medium darstellen. Um das Wachstum zu optimieren schien die Arbeit mit einer Vorkultur und einer Hauptkultur sinnvoll. Folgende Inkubationsprozedur kam bei DSM 20300 Mutanten zur routinemäßigen Anwendung:

- 1.) Herstellung einer Vorkultur von DSM 20300 Mutanten  
16 h 20 °C 1100 rpm  
Die Extinktion<sub>550</sub> wird 1:20 mit Hilfe des Easy Readers (Tecan, Crailsheim) geprüft.
- 2.) Herstellung der Hauptkultur: 200 µl MM2\_2 + 2 µl Vorkultur  
7 h 32 °C 1100 rpm  
Die Extinktion<sub>550</sub> wird 1:20 mit Hilfe des Easy Readers (Tecan, Crailsheim) geprüft.
- 3.) Mindestens 12 h 4 °C stellen

Im Rahmen eines automatisierten Screenings könnte ein Roboter regelmäßig die Trübung der Mutanten-Hauptkulturen testen und nur Zellsuspensionen mit optimaler Extinktion für den Einsatz im *E. coli* Test entnehmen. Dadurch würden auch langsam wachsende Mutanten erfasst werden, die bei der manuellen Bearbeitung der 96 well Platten aus Zeitgründen durch das Screening-Raster (7 h 32 °C 1100 rpm = Stopp der Hauptkultur) fallen.

#### **5.3.2.c Vermessung von *C. glutamicum* DSM 20300 Mutanten mit dem *E. coli* B834 Test im 96 well Maßstab**

Durch die bereits in Abschnitt 5.3.2.a (S. 88ff.) beschriebenen Untersuchungen zur Vermessung des Wildtyps von DSM 20300 auf Met-Bildung wurde klar, dass eine Vermessung zellfreier Proben folgende Punkte berücksichtigen muss:

- Das Messergebnis muss gleich oder nahe dem Nullwert für eine Met-Vermessung sein, da der Wildtyp weder in der exponentiellen noch in der stationären Phase zur Met-Überproduktion in der Lage ist.

- Die zellfreien Mutanten-Proben sollten sich im Bereich exponentiellen Wachstums befinden, da laut Literatur die Met-Bildung von *C. glutamicum* DSM 20300 und seiner Mutanten wachstumsgekoppelt verläuft und mit Zunahme der Extinktion die Chance auf Met-Bildung erhöht wird.
- Die Proben sollten sich weiterhin in der exponentiellen Phase befinden, da ab der Stationärphase Substanzen durch Zell-Lyse freiwerden, die den *E. coli* Test im Met-Nachweis stören und falsch positiv reagieren lassen.
- Direkt nach Inkubationsende werden die Proben für mindestens 12 h bei 4 °C dunkel gelagert, um Enzymreaktionen und Proteinspaltungen zu verhindern; temperaturempfindliche Enzyme, die den *E. coli* Test stören könnten, werden bei einer 4 °C-Lagerung in ihrer Funktionalität beeinträchtigt und unwirksam gemacht.

In Vorbereitung auf den folgenden *E. coli* Test muss in jeder Mutanten-Kultivierungsplatte die Reihe D der 96 well Platte freigehalten werden, um im späteren Verlauf der Screening-Prozedur zellfreie Überstände in die Test-Platte überführen zu können (ohne Reihe D). Die Reihenfolge der Mutanten innerhalb der MM2\_2-Kultivierung ist identisch mit der Reihenfolge ihrer Vermessung im Rahmen des *E. coli* B834 Tests. Die zu vermessenden Mutanten-Proben sollten sich im Bereich einer Extinktion<sub>550</sub> von 3-8 befinden. Die Proben werden nach ihrer 4 °C-Lagerung für 5 min bei 4 °C und 5000 g zentrifugiert. Die zellfreien Überstände werden entnommen (ohne Reihe D) und direkt in die *E. coli* Test-Platte überführt.

#### **Vorbereitung und Inkubation der *E. coli* Test-Platte:**

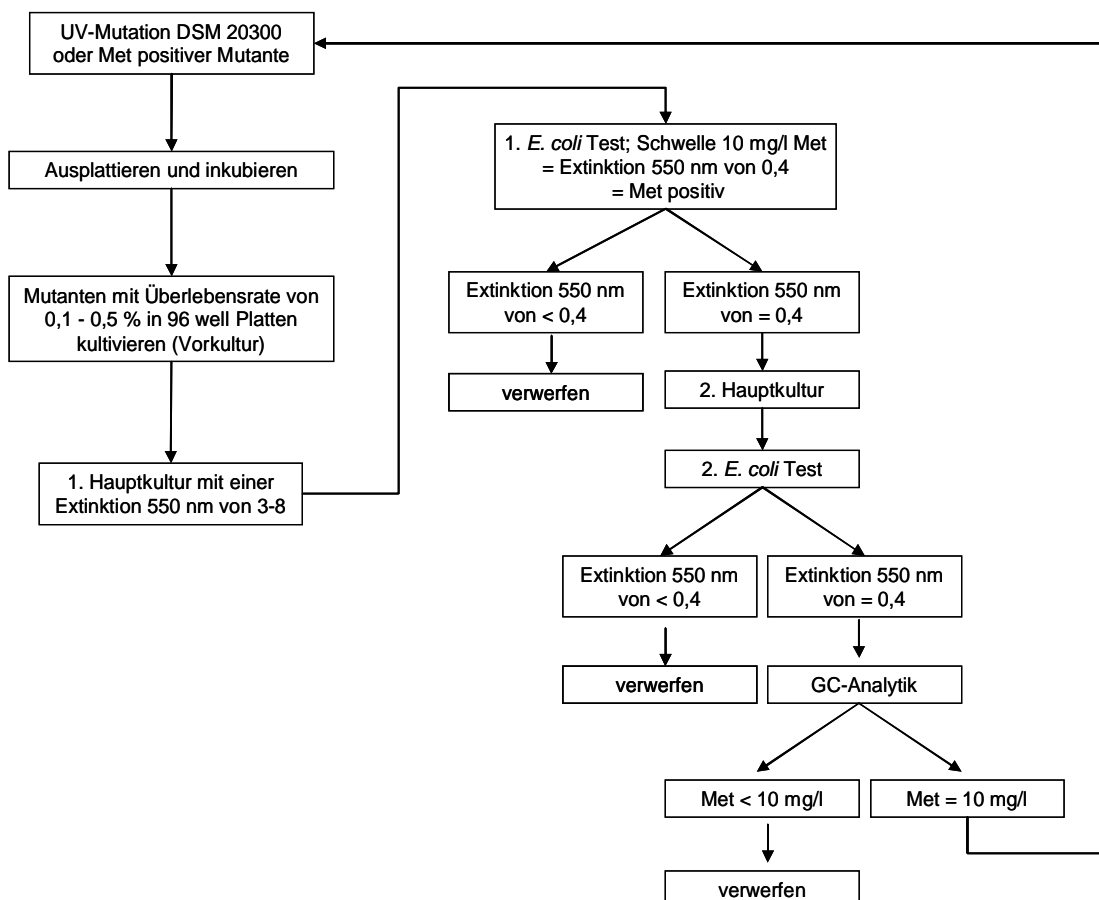
- Pro well 190 µl Gemisch aus 85 % B74, 5 % *E. coli* Inokulum, 5 % MM2\_2 vorlegen
- Reihe D 1-6 unverändert als Negativ-Kontrolle belassen, Reihe D 7-12 + 10 µl eines 5 mg/l Met-Standards in Wasser zupipettieren
- Je 5 µl zellfreier Mutanten-Kulturüberstand (ohne Reihe D) kann nun aus der Kulturplatte direkt in den *E. coli* Test eingebracht werden; die Met-Schwelle liegt dadurch bei einer Konzentration von 10 mg/l Met, d.h. ab 10 mg/l Met zeigt der *E. coli* mit einer Extinktion<sub>550</sub> von 0,4 an, dass sich Met in der Probe befindet; eine Extinktion von 0,2 oder nahe 0,2 ist der Wert der Negativkontrolle (Tab. 19, S. 122)
- Inkubation: 6 h, 35 °C, 1100 rpm; mit Acetat-Folie verschlossen

- Auswertung mit Hilfe des Easy Readers bei 550 nm; im *E. coli* Test positive Kandidaten werden mit GC auf Met-Bildung geprüft

### 5.3.3 Screening nach Methionin-Überproduzenten im Hochdurchsatz

Die Screening-Prozedur (Abschnitt 5.3, S. 86ff. und Abb. 51, S. 127), um Met-Überproduzenten in einer Population von UV-Mutanten des Stammes DSM 20300 zu selektieren, besteht aus vier hintereinandergeschalteten Einheiten:

- UV-Mutation (Abschnitt 4.5.11, S. 45ff. und 5.3.1, S. 86ff.)
- Mutantenkultivierung im 96 well Maßstab (Abschnitt 5.3.2.b, S. 87ff.)
- *E. coli* Test zum Met-Nachweis (Abschnitt 5.3.2.a, S. 88ff. und 5.3.2.c, S. 125ff.) im 96 well Maßstab
- Prüfung der im *E. coli* Test Met-positiven Mutanten mittels GC



**Abb. 51:** Screening-Schema zur Selektion von Met-Überproduzenten

- UV-Mutation

Eine Zellsuspension von *C. glutamicum* DSM 20300 mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 6 in 0,1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bis zu einer Überlebensrate von 0,1-0,5 % der Zellen mutiert (Abschnitt 4.5.11, S. 45ff. und 5.3.1, S. 86ff.). Da von einer stufenweise auftretenden Verbesserung der Met-Bildungsrate im Verlauf hintereinandergeschalteter Mutationen auszugehen ist, sollte zunächst eine Met-überproduzierende Mutante gefunden werden, die im Bereich einer 10 mg/l Met-Bildungsrate liegt und sich damit bereits deutlich vom Wildtyp unterscheidet. Mit dieser sollte eine neue Mutationsrunde durchgeführt werden. Unter den gewonnenen Mutanten sollte die Met-Bildungsrate dann = 20 mg/l betragen. Dieser Vorgang sollte solange wiederholt werden, bis ein Met-Überproduzent im Konzentrationsbereich x g/l gefunden wird.

- Mutantenkultivierung im 96 well Maßstab

Die 48 h bei 30 °C inkubierten Mutanten Einzelkolonien wurden von 53er Platte zum Beimpfen einer Vorkultur im 96 well Maßstab eingesetzt (Abschnitt 5.3.2.b, S. 87ff.). Die Vorkultur in MM2\_2 Medium wurde für 16 h bei 20 °C und 1100 rpm im PST-60 HL Thermoshaker (Kisker, Steinfurt) inkubiert; 2 µl der Vorkultur wurden in der ersten Hauptkultur in MM2\_2 eingesetzt, welche 7 h bei 32 °C und 1100 rpm inkubiert wurde. Die Extinktion<sub>550</sub> des Wildtyps lag nach dieser Inkubation im Bereich Extinktion<sub>550</sub> von 3-8. Die 1. Hauptkultur wurde für mindestens 12 h bei 4 °C dunkel aufbewahrt.

- *E. coli* Test zum Met-Nachweis im 96 well Maßstab

Mit Hilfe von *E. coli* B834 wurden die zellfreien Überstände der Mutanten von DSM 20300 auf Met-Bildung vermessen (Abschnitt 5.3.2.a, S. 88ff. und 5.3.2.c, S. 125ff.). Ein Gemisch aus 85 % B74, 5 % *E. coli* Inokulum und 5 % MM2\_2 wurde vorbereitet und á 190 µl pro well in die Test-Platte vorgelegt. In Reihe D wurden Positiv- und Negativ-Kontrolle des Met-Nachweises eingefügt, in alle anderen wells wurden jeweils 5 µl zellfreien Mutantenüberstandes gegeben. Die Inkubation des Tests erfolgte für 6 h bei 35 °C und 1100 rpm im PST-60 HL Thermoshaker (Kisker, Steinfurt), die Auswertung der Extinktion<sub>550</sub> mit Hilfe des Easy Readers (Tecan Crailsheim). Eine Extinktion von 0,2 entspricht 0 mg/l Met und eine Extinktion von



0,4 einer Met-Konzentration von 10 mg/l. Die einmal im *E. coli* Test Met-positiven Mutanten wurden in einer zweiten Hauptkultur kultiviert und ein zweites Mal im *E. coli* Test auf Met-Bildung vermessen.

- Prüfung der im *E. coli* Test Met-positiven Mutanten mittels GC

Nur die zweimal im *E. coli* Test Met-positiven Mutanten wurden nach Derivatisierung mit dem EZ:faast-Kit (Phenomenex, Aschaffenburg) per GC auf Met-Bildung vermessen.

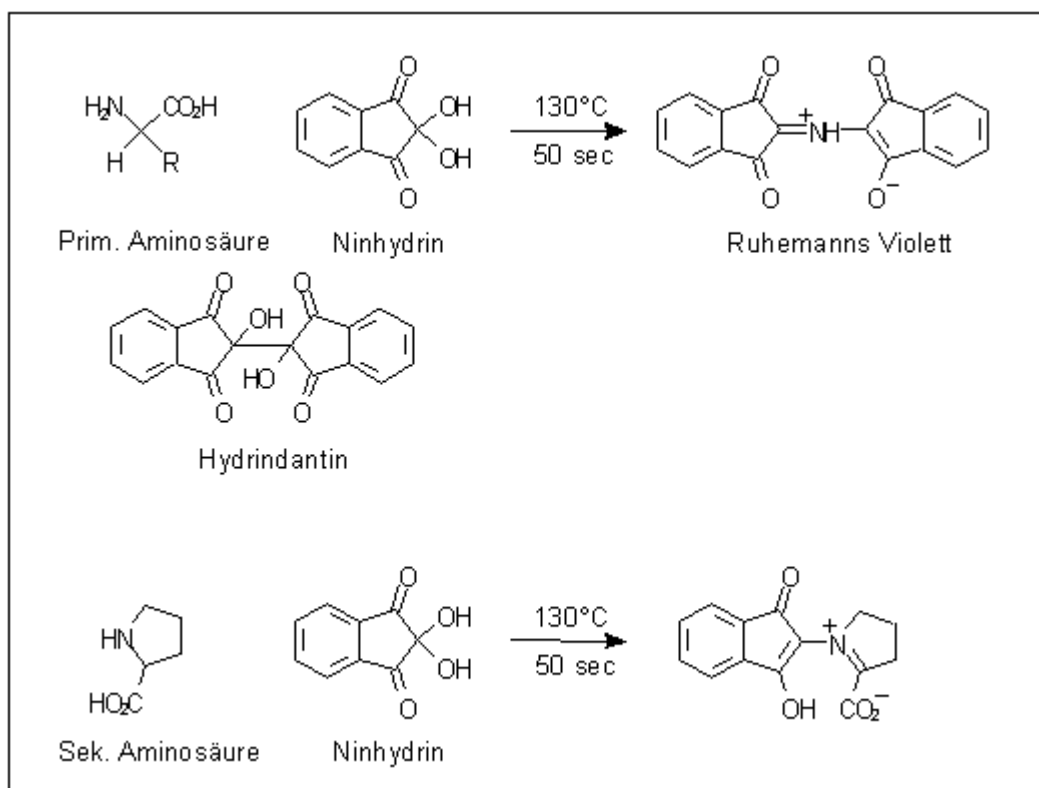
Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Screening-Prozedur im 96 well Maßstab können pro Person bis zu 6000 Mutanten/ Monat auf Met-Bildung untersucht werden. Insgesamt wurden auf diese Weise 20.000 Mutanten auf Met-Bildung getestet. Es wurde kein Met-Überproduzent identifiziert, wobei angemerkt werden muss, dass in dieser Arbeit aus Zeitgründen der Schwerpunkt auf die Untersuchung der exponentiellen Phase der Mutanten gelegt wurde und langsam bzw. schlecht wachsende Mutanten durch das angelegte Screening-Raster verloren gingen. Es ging hauptsächlich um die Strategieentwicklung und die statistische Absicherung der Methode durch zahlreiche Anwendungsbeispiele. Die Zell-Lyse von Mutanten wurde durch kurze Inkubationszeiten der Vor- und Hauptkultur vermieden, da der bislang entwickelte *E. coli* Test zum Nachweis von Methionin nur für die Vermessung von zellfreien Überständen aus der exponentiellen Phase und wässrige Methionin-Standards störungsfrei verläuft.

### **5.3.4 GC-Analytik für Methionin und Optimierung**

Das Prinzip der Gaschromatographie bei Anwendung des EZ:faast-Kits zur Derivatisierung Aminosäure-haltiger Proben wurde bereits in Abschnitt 4.5.10 (S. 41ff) beschrieben. Trotz langjähriger Etablierung der HPLC in der Aminosäureanalytik seit den 50er Jahren bietet die GC einige Vorteile:

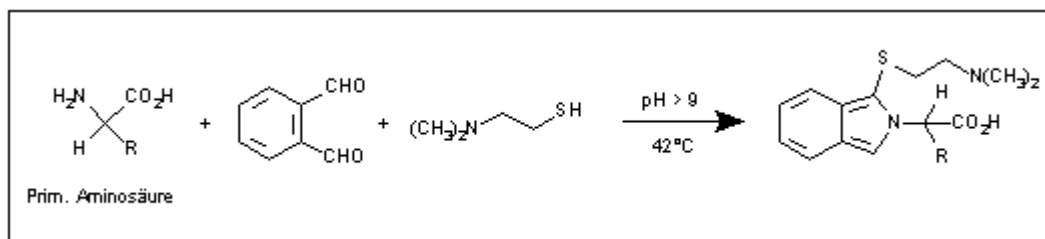
- kürzere Analysendauer (geringer Strömungswiderstand)
- höhere Trennschärfe durch englumige Kapillarsäulen

Mit Ausnahme von Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin müssen alle Aminosäuren vor einer HPLC-Analytik derivatisiert werden, da sie nicht über UV-absorbierende Chromatophore verfügen. Es wird die Vorsäulenderivatisierung von der Nachsäulenderivatisierung unterschieden; beide Methoden finden in vollautomatisierter Ausführung in sogenannten Aminosäure-Analysen Anwendung. Die „Moore-Stein-Technik“ genannte Analytik von Aminosäuren mittels Ionenaustauschersäule und Nachsäulenderivatisierung war eine der frühesten HPLC-Methoden (Moore, S. et al., 1958; Moore, S. and Stein, W.H., 1948). Das gebräuchlichste Reagenz für die Nachsäulenderivatisierung von Aminosäuren ist Ninhydrin. Es bildet mit primären Aminen eine violette Verbindung mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm, wobei Hydrindantin als Katalysator fungiert, und mit sekundären Aminen eine gelbe Verbindung mit Absorptionsmaximum bei 440 nm ([www.pickeringlabs.de](http://www.pickeringlabs.de)).



**Abb. 52:** Derivatisierung von primären und sekundären Aminosäuren mit Ninhydrin; ([www.pickeringlabs.de](http://www.pickeringlabs.de))

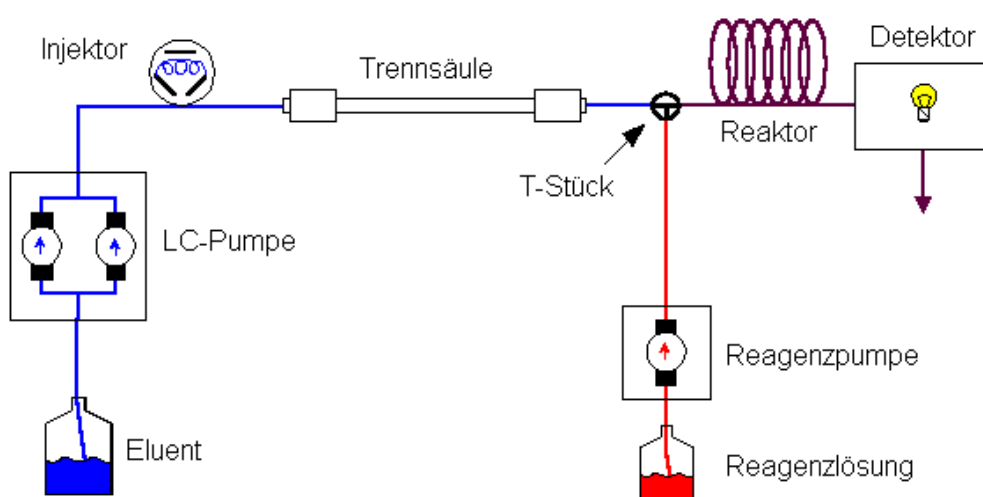
Um höhere Nachweisempfindlichkeiten zu erzielen, arbeitete Roth mit u. a. o-Phthaldialdehyd (OPA) in Gegenwart reduzierender Agenzien wie  $\text{KBH}_4$  oder Thiolen wie z.B. 2-Mercaptoethanol oder Phenylisothiocyanat (PITC) in alkalischem Milieu (pH 9-10), wobei sich fluoreszierende Aminosäurederivate bildeten (Roth, M., 1971).



**Abb. 53:** Derivatisierung von primären Aminosäuren zu fluoreszierenden Isoindolderivaten; ([www.pickeringlabs.de](http://www.pickeringlabs.de))

### Nachsäulenderivatisierung

Eine Nachsäulenderivatisierung erhöht bei vielen HPLC-Applikationen (u. a. auch in der AS-Analytik) die Sensitivität bzw. Selektivität der Methode ([www.pickeringlabs.de](http://www.pickeringlabs.de)). Manche Substanzen sind für z.B. UV/VIS-Detektoren so gut wie unsichtbar; daher werden sie nach der Säulentrennung in einer chemischen Reaktion so verändert, dass das Produkt nun physikalisch-chemische Eigenschaften besitzt, die vom Detektor erfasst werden können (z.B. Entstehung einer Eigenfluoreszenz).



**Abb. 54:** Schematischer Aufbau eines Nachsäulenderivatisierungssystems; ([www.pickeringlabs.de](http://www.pickeringlabs.de))

In Abb. 54 (S. 131) erkennt man, dass das von der Trennsäule kommende Eluens mit einer Reagenzlösung gemischt wird, um dann durch den Reaktor zum Detektor geleitet zu werden. Im Reaktor bleibt genug Zeit für den Ablauf der chemischen Reaktion; die Dauer kann durch Erhöhung der Temperatur verringert werden. Das Reaktionsgemisch aus Eluens und Reagenz passiert den Detektor (gewöhnlich UV/VIS oder Fluoreszenzdetektor).

#### Vorsäulenderivatisierung

Bei der Vorsäulenderivatisierung werden Aminosäuren z.B. mit Hilfe von OPA und 2-Mercaptoethanol oder Phenylisothiocyanat (PITC) derivatisiert. Die Trennung der Amin-Derivate erfolgt auf der Säule mit anschließender Detektion im Fluoreszenz-Detektor.

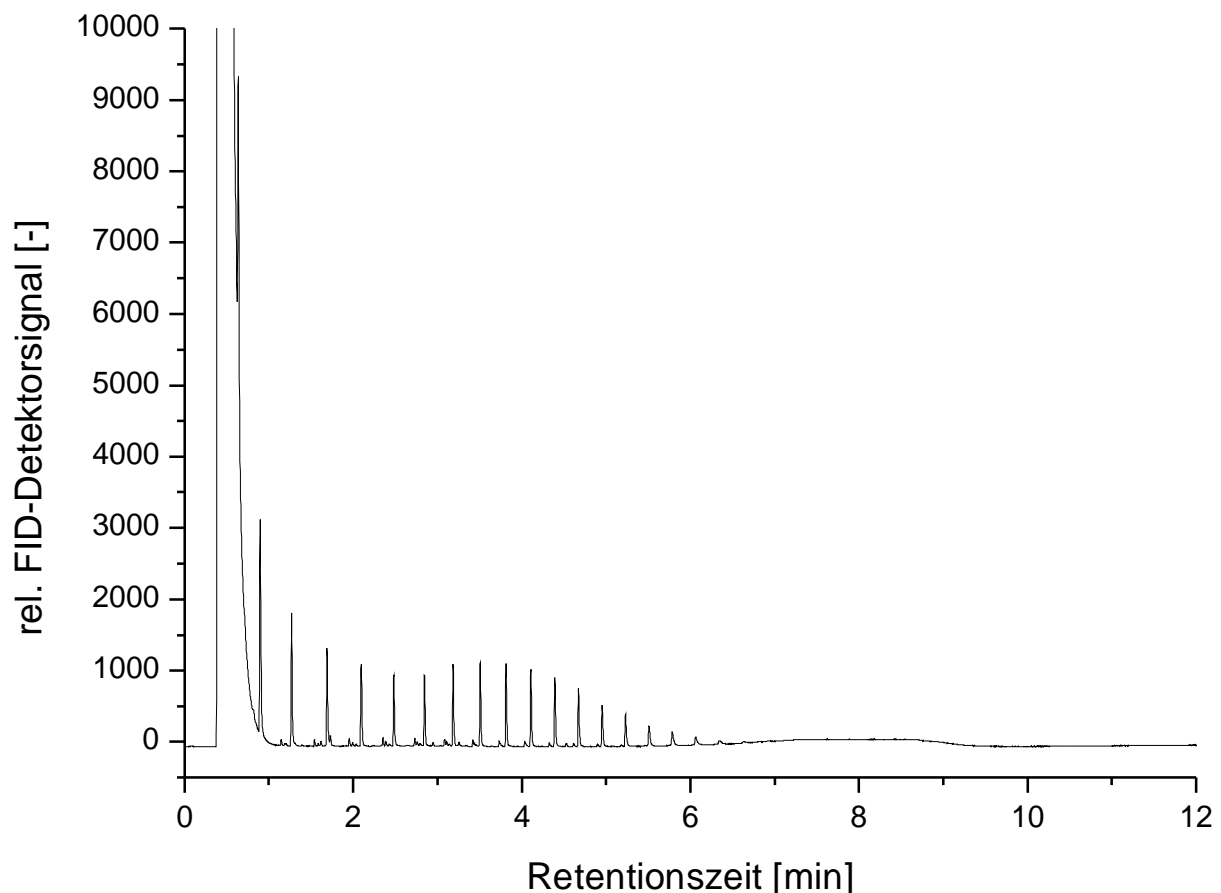
In der Dissertation von In-Girl Baek (Baek, I.-G., 1999) und der Diplomarbeit von C. Wöbbeking (Wöbbeking, C., 2005) wird ein guter Literatur-Überblick über die Entwicklungsschritte der HPLC in der Aminosäureanalytik gegeben.

#### 5.3.4.a Probleme und Lösungsstrategien

Bei der Arbeit mit der GC als Methode für die Aminosäureanalytik ergaben sich einige Probleme:

In Lösung 4 und 5 der Derivatisierungsreagenzien des ez:faast-Kits befindet sich das Lösungsmittel Isooctanol. Durch Einsatz verschiedener Septen in den Probenaufgabegefäßen konnte herausgefunden werden, dass beim Durchstechen des Vial-Septums Isooctanol-Dämpfe Substanzen aus den Septen herauslöst und diese im Chromatogramm als homologe Reihe von Untergrund-Störpeaks erscheinen (Abb. 55, S. 134) Es könnte sich um nicht polymerisierte Siloxan-Einheiten handeln, dem Ausgangsmaterial bei der Herstellung von Silikon.

Die in Abb. 55 auf S. 134 gezeigte homologe Reihe von Siloxaneinheiten weist Peaks unterschiedlicher Höhe auf; es besteht eine Korrelation zwischen Peakhöhe und Kettenlänge der Siloxaneinheiten, d.h. eine längere Kettenlänge entspricht einem höheren Peak. Voraussetzung für eine reproduzierbare Probenaufgabe und Vermessung ist, dass der Bereich der für die Untersuchung relevanten Retentionszeiten keine Störpeaks im zu vermessenden Konzentrationsbereich enthält. Um diese Störpeaks zu reduzieren wurden zum einen Septen verschiedener Hersteller getestet, zum anderen wurde vor jeder Probenmessung 2x Isooctanol zur Konditionierung des Systems eingespritzt. Damit wurde eine Probenaufgabe simuliert; ab der 3. Einspritzung waren die Störpeaks auf ein Minimum reduziert, so dass sie keinen Einfluss mehr auf einen Konzentrationsbereich von Methionin zwischen 1-3 mg/l nehmen konnten. Je nach Qualität der im Versuch eingesetzten Silikonsepten waren die Störpeaks kleiner oder größer. Die kleinsten Peaks wurden bei Verwendung von Septen „Dichtscheibe G8-Sil“ (CS-Chromatographie-Service GmbH, Langerwehe) erzielt. Diese wurden in Folge ausschließlich bei der Vermessung eingesetzt; die auftretenden Störpeaks waren im Bereich der Met-Vermessung bei einer Konzentration um 1-3 mg/l vernachlässigbar klein.



**Abb. 55:** Beispielchromatogramm einer GC-Vermessung von durch Isooctanol aus Silikonsepten herausgelösten Siloxaneinheiten; im Versuch wurden Silikonsepten verschiedener Hersteller zusammen mit Isooctanol in ein Becherglas gegeben und 15 min ins Ultraschallbad gestellt; der Überstand wurde per GC vermessen.

#### Optimierung des Temperaturprogramms und der Flussrate

Im Hinblick auf die Etablierung eines Hochdurchsatzscreenings nach Methionin-Überproduzenten sollte die Analysendauer je Probe verkürzt werden; wichtige Voraussetzung war, dass die Trennleistung im Bereich der Retentionszeit des Methionin-Peaks im Konzentrationsbereich von 1 mg/l Methionin (Met) erhalten blieb (Basislinien getrennt); viele Proben sollten schnell bei hoher Trennleistung bearbeitet werden können. Die hohe Auflösung bis hin zu 1 mg/l Met war erforderlich, da der Wildtyp DSM 20300, der die Grundlage für die Mutationen bildete, Met in genau diesem geringen Umfang in der exponentiellen bzw. stationären Phase bildet:

- Die Firma Phenomenex gibt in ihrer Bedienungsanleitung zur Anwendung des EZ:faast-Kits mit anschließender GC-Analytik die Vorgabe eines Temperaturprogramms mit einer kontinuierlichen Heizrate von 32 °C/min von 110 °C bis 320 °C. Der in dieser Arbeit eingesetzte Gaschromatograph GC17A (Shimadzu, Duisburg) ist dazu nicht in der Lage. Es wurde alternativ mit 2 Temperaturrampen gearbeitet: a) 35 °C/min von 110 °C bis 250 °C; b) 30 °C/min von 250 °C bis 330 °C; für dieses Gerät stellt das vorgestellte Temperaturprogramm die maximale Geschwindigkeit und Trennleistung dar. Die einzigen Peaks, die nicht basisliniengetrennt sind, ist eine 3er Peakansammlung von Leucin, Isoleucin und allo-Isoleucin, die aber auch in der Methode der Firma Phenomenex nicht basisliniengetrennt ist.
- Am Ende jeder Messung wird die Säule für 4 min bei 330 °C ausgeheizt, um schwer flüchtige Substanzen zu eliminieren, die ansonsten bei erneuter Messung zu Verschleppungen im Anfangsbereich einer neuen Probenmessung führen könnten. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt in der Erhöhung der Reproduzierbarkeit von Messung zu Messung, da zu Beginn jeder Probenmessung immer die gleichen Ausgangsbedingungen in der Säule vorliegen. Nachteilig ist die schnelle Alterung der Säule durch gefahrene Temperaturgradienten und Ausheizen bei höherer Endtemperatur, sog. Säulenbluten.
- Die Flussrate des Trägergases H<sub>2</sub> wurde unter Einhaltung der Gesetzmäßigkeiten der Van Deemter Gleichung (Van Deemter, 1956) erhöht. Van Deemter beschreibt mathematisch bzw. physikalisch die Trennleistung in der Gas- und Flüssigchromatographie, wobei die Bodenhöhe H in Abhängigkeit von der mittleren Trägergasgeschwindigkeit u sinkt oder steigt. Dabei wird die Säule als Aneinanderreihung von Gleichgewichtsstufen zwischen stationärer und mobiler Phase aufgefasst; so kann die Höhe eines theoretischen Bodens berechnet werden. Der Boden stellt dabei das gedachte Teilstück der Trennsäule dar, in dem gerade eine Gleichgewichtseinstellung erfolgt. Die Van Deemter Gleichung lautet:

$$H = A + (B/u) + C * u = L/N$$

H = Bodenhöhe

L = Länge der Säule

$N$  = Trennstufenzahl bzw. Bodenzahl

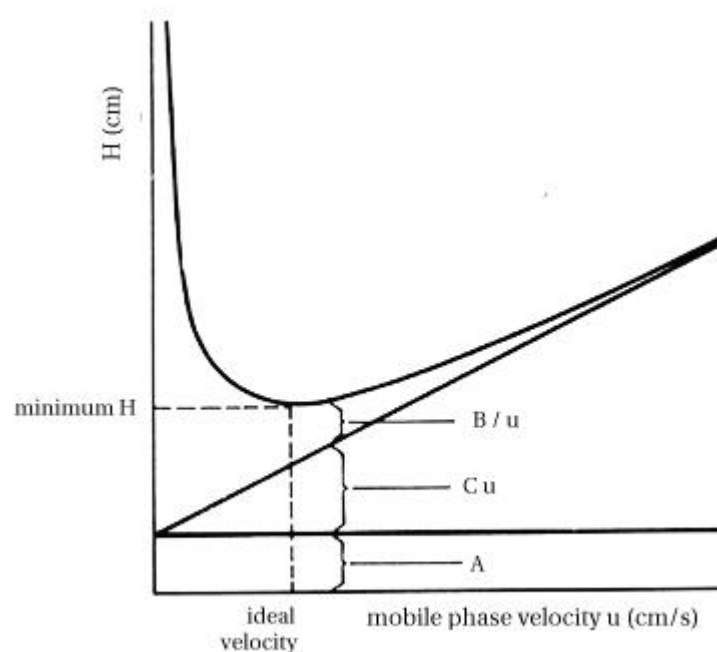
$u$  = lineare Trägergasgeschwindigkeit

$A$  = strömungsabhängige Streudiffusion/Wirbeldiffusion/Eddy-Diffusion. Bei gepackten Säulen erhöht die Verwirbelung diese Konstante. Bei Kapillarsäulen entfällt dieser Term [ $A = 0$ ].

$B$  = Longitudinal-Diffusion, Diffusion in Längsrichtung. Dieser Faktor ist abhängig von der Viskosität und Temperatur des Trägergases; nimmt Einfluss auf die Peakverbreiterung.

$C$  = beschreibt den Massenübergang zwischen stationärer und mobiler Phase. Dieser Term wird durch die Art des Trägergases, die Art und Dicke der stationären Phase beeinflusst. Einfluss der nicht optimalen Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zwischen mobiler und stationärer Phase.

Die Gleichung zeigt ein Minimum bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase. In diesem Minimum ist die Höhe der theoretischen Böden am kleinsten, die Anzahl der Böden in einer stets gleichlangen Säule am größten. In diesem Minimum sind also die größte Trennstärke der Säule und die schmalsten Peaks zu erreichen (Abb. 56, S. 137).



**Abb. 56:** Van Deemter Zusammenhang zwischen Bodenhöhe und Fließgeschwindigkeit (Van Deemter, 1956)



- Zu Beginn der GC-Methodenentwicklung war die Retentionszeit bei 1. Messung gegenüber der 2. Messung verschoben; bei der 2. Messung waren die Retentionszeiten für die Aminosäuren immer etwas kürzer, die folgenden Messungen hatten mit der 2. Messung übereinstimmende Retentionszeiten. Grund dafür war der Unterschied zwischen Ofentemperatur und Säulentemperatur beim Aufheizen und Abkühlen innerhalb des Temperaturprogramms der Methode; die Haltezeit von 4 min bei 330 °C am Ende jeder Probenmessung trägt zur Vermeidung von Probenverschleppungen und guter Reproduzierbarkeit bei. In einer Reihe von Messungen startet die Säule ab der 2. Messung mit einer etwas höheren Ausgangstemperatur von ca. 140 °C. Bei der 1. Messung hatten Säule und Ofen noch die Ausgangstemperatur von 110 °C, was die etwas längeren Retentionszeiten gegenüber den Folgemessungen erklärt. Die Wartezeit zwischen den Messungen ist demnach zwar etwas zu kurz für eine Abkühlung von Säule und Ofen auf 110 °C, aber die Prozedur ist mittels Autosampler reproduzierbar bei verkürzter Analysendauer je Probe.

#### Optimierung der Derivatisierung

- Bei Vermessung vieler Proben sollten diese im Autosampler bei 4 °C gekühlt werden, um die Stabilität der Derivate zu gewährleisten.
- Proben können 3x unmittelbar hintereinander ohne Unterschiede im Ergebnis vermessen werden. Sobald das Septum aber durchstoßen wurde, ändern sich die Konzentrationen der Aminosäuren bei Mehrfachmessung im Abstand von einigen Stunden oder Tagen (trotz -20 °C-Lagerung) sehr schnell durch die Flüchtigkeit einiger Bestandteile des Kits durch die Einstichstelle im Septum des GC-Vials.
- Unterschiedliche Medien haben je nach Zusammensetzung einen verschieden großen Einfluss auf die Qualität der Derivatisierung. Medien, die große Salzmenge enthalten z.B. 5-10 g/l und mehr, können die Bindung der Aminosäuren an den Ionenaustauscher behindern, so dass es im Chromatogramm zum Verlust einiger Aminosäuren kommt, obwohl diese im Medium enthalten sind. Im B74-Medium gab es in diesem Zusammenhang keine Probleme, aber ab der Verwendung von MM1 und

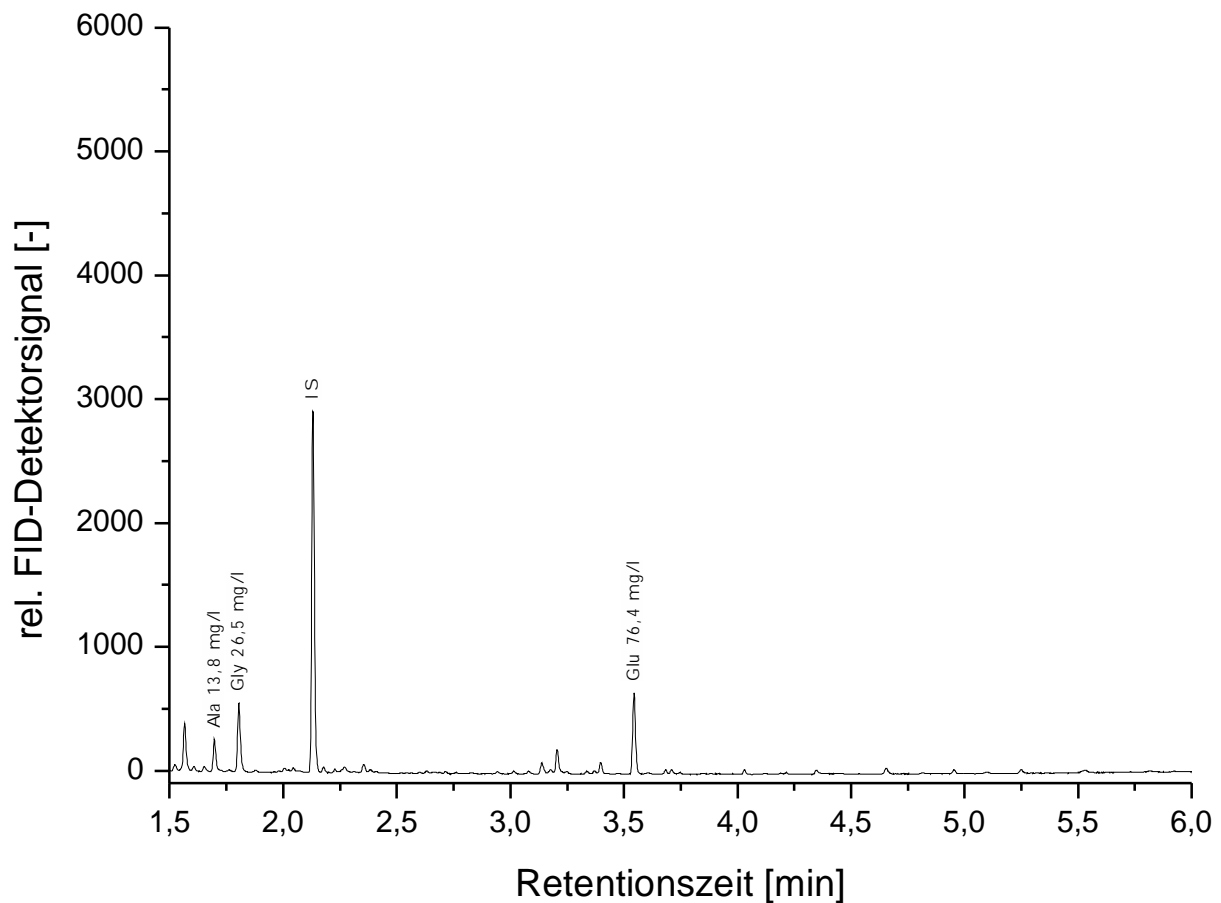
MM2 ergaben sich Schwierigkeiten, die Derivatisierung der Aminosäuren reproduzierbar durchzuführen. Eine Verdünnung des entsprechenden Mediums kann die Salzeffekte minimieren geht aber auf Kosten der Nachweisgrenze, wenn die zu untersuchende Aminosäure bereits im unverdünnten Zustand nur eine Endkonzentration zwischen 1-5 mg/l aufweist. Eine standardisierte 1:5 Verdünnung der MM2\_2-Proben konnte das Problem beseitigen. Ein weiteres Problem ergibt sich durch die Pufferung vieler Medien. Laut Vorgabe von Phenomenex muss das Gemisch aus Probe und Reagenz 1 im 1. Schritt der Derivatisierung einen pH-Wert zwischen 1,5-6 ergeben. Der Phosphatpuffer in MM2\_2 puffert aber bei einem pH-Wert von 7,3; die Zugabe von Reagenz 1 reicht nicht aus, um den pH-Wert auf weniger als 7 abzusenken. Die Proben wurden in Folge bei 1:5 Verdünnung folgendermaßen vorbereitet, um bei gepufferten Proben einen pH von ca. 2 zu erzielen: 20 µl Probe + 100 µl Reagenz 1 und 280 µl 10 mM HCl.

## **5.4 Aminosäurespektren von *C. glutamicum* DSM 20300, UV-Mutanten, ATCC 21608 und eines potenziellen industriellen Produktionsstammes für Met**

Aus der Literaturrecherche zum Thema biotechnische Methionin-Produktion ging hervor, dass die Methionin-Bildung wachstumsgekoppelt verläuft. Damit erschien die späte exponentielle Phase für einen Schnell-Test auf Met-Überproduktion bei Mutanten sinnvoll. Im Screening nach Met-Überproduzenten wurden daher nur Mutanten in der exponentiellen Phase berücksichtigt. Mit einer kleinen Stichprobe sollte geprüft werden, in welcher Form sich die Aminosäurespektren einer Auswahl von Mutanten im Vergleich zum Spektrum des Wildtyps in der exponentiellen Phase darstellen. Untersuchungen zur Stationärphase des Wildtyps und einiger Mutanten schlossen sich an.

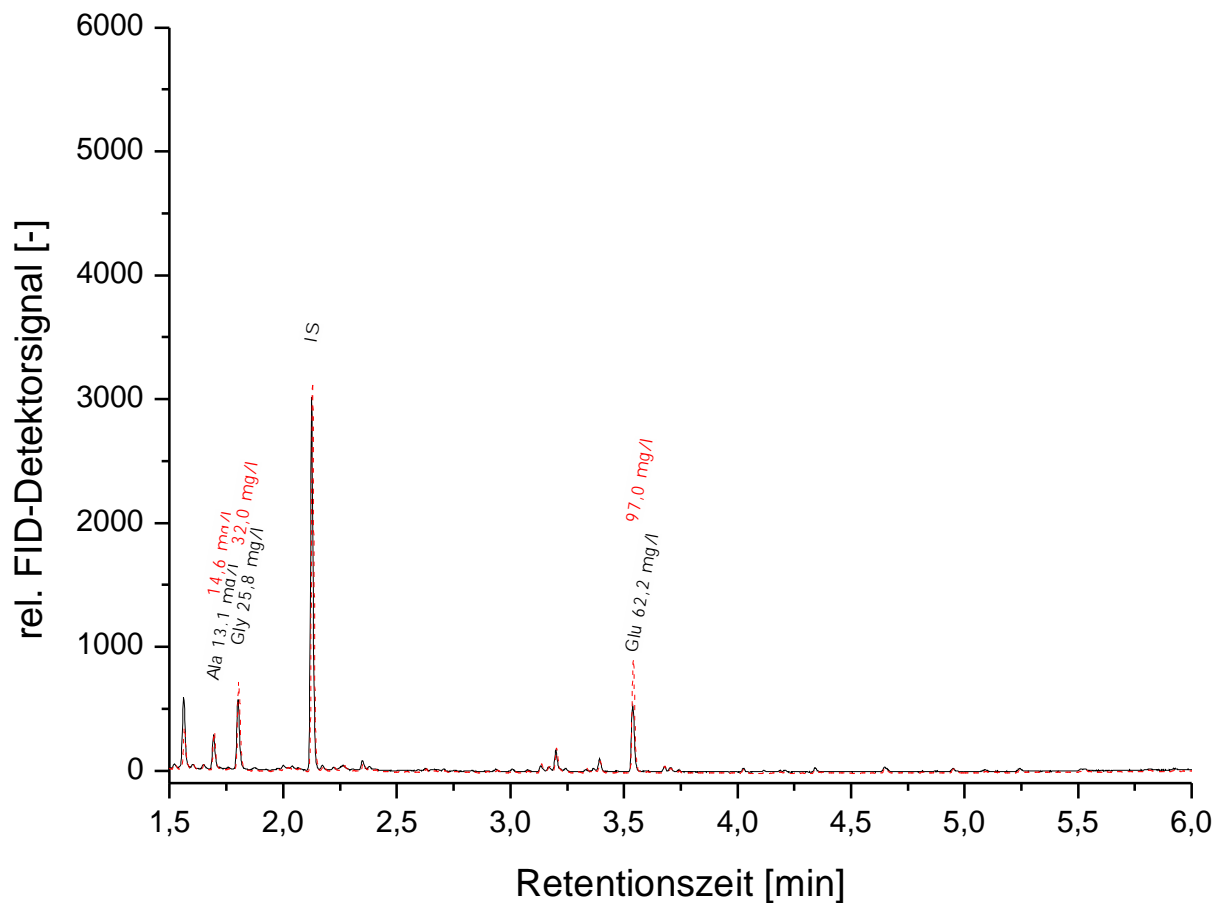
### **5.4.1 Untersuchungen zur exponentiellen Phase**

Es wurden nach dem Zufallsprinzip 50 Mutanten-Einzelkolonien von 53er Platte in MM2\_2—Vorkultur (VK) und Hauptkultur (HK) kultiviert. Für die VK wurde je 1 Einzelkolonie in 200 µl MM2\_2 pro well eingerieben und für 16 h bei 20 °C und 1100 rpm im Thermoshaker inkubiert. Die Extinktion<sub>550</sub> betrug bei allen Mutanten zwischen 0,4 und 2,0. Mit Hilfe der VK wurde eine HK hergestellt. 200 µl MM2\_2 wurden mit je 4 µl VK pro well vereint und für 9,5 h bei 32 °C und 1100 rpm im Thermoshaker inkubiert. Die Extinktion<sub>550</sub> lag bei allen Mutanten mitten in der exponentiellen Phase des Wachstums zwischen 5,4 und 7,0. Neben den 50 Mutanten wurde auch der Wildtyp von DSM 20300 (WT) im 12fach-Ansatz in VK und HK inkubiert, um einen direkten Vergleich mit den Mutanten zu ermöglichen. Die WT-VK zeigte eine Extinktion<sub>550</sub> von 2,2-8,0, die HK von 3,0-8,0. Die 50 Mutanten-HKen wurden aufgrund der gemessenen Extinktion in 2 Gruppen eingeteilt, die 1. Gruppe umfasste einen Extinktionsbereich<sub>550</sub> von 6,2-7,0 (Probe 4-29) und die 2. Gruppe von 5,4-6,0 (Probe 30-50). In der Vermessung per GC sollte zum einen geprüft werden, ob sich die Aminosäurespektren der Mutanten von denen des WT in der exponentiellen Phase deutlich unterscheiden, zum anderen, ob sich die Spektren der Mutanten mit unterschiedlichen Extinktionen innerhalb der exponentiellen Phase unterscheiden (Abb. 57, S. 149).



**Abb. 57:** Aminosäurespektrum Wildtyp DSM 20300 bei Extinktion<sub>550</sub> 8,0

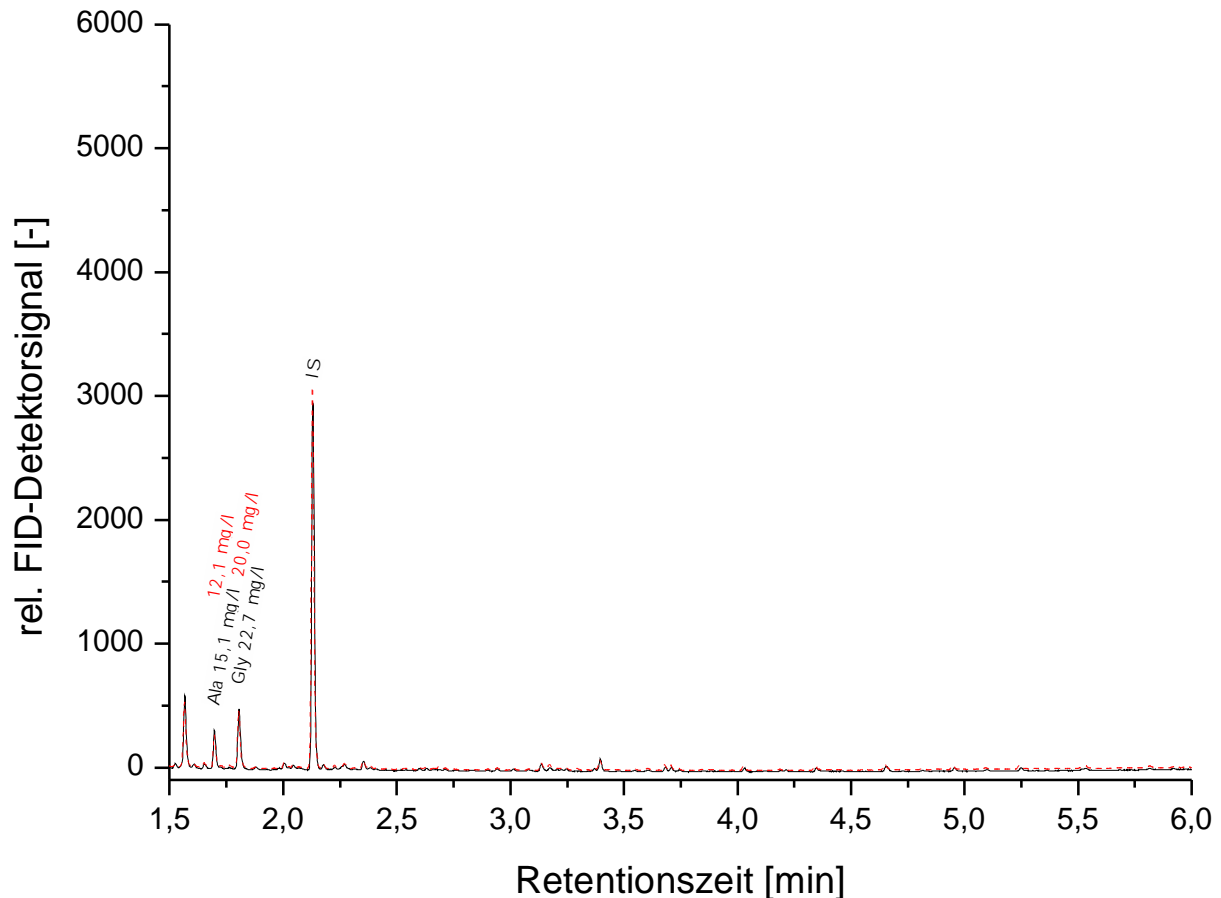
Es zeigte sich, dass der WT bei einer Extinktion<sub>550</sub> von 8,0 ungefähr die gleichen Aminosäurespektren zeigt wie die 50 vermessenen Mutanten bei einer Extinktion<sub>550</sub> 5,4-7,0. Es sind nicht alle Aminosäuren des Spektrums in der späten exponentiellen Phase vertreten, die Aminosäuren Alanin (Ala), Glycin (Gly) und Glutaminsäure (Glu) treten in den Vordergrund, während andere Aminosäuren gar nicht oder nur in vernachlässigbar kleinen Mengen gebildet und daher in den gezeigten Chromatogrammen (Abb. 57, 58, 59, S. 140-142) nicht näher beschriftet wurden. Die Peaks für Ala, Gly und Glu variieren in der Höhe. Bei einigen Mutanten ist kein Glu-Peak vorhanden. Selbst die Untersuchung des WTs im Mehrfachansatz zeigte unterschiedlich hohe Peaks für Ala, Gly und Glu, obwohl die Extinktion<sub>550</sub> der Proben bei konstant 8,0 lag.



**Abb. 58:** Aminosäurespektrum zweier Mutanten bei unterschiedlichen Extinktionen innerhalb der exponentiellen Phase des Wachstums\_1. In schwarz Mutante 19 im Extinktionsbereich der 1. Gruppe von 6,2-7,0; in rot Mutante 34 im Extinktionsbereich der 2. Gruppe von 5,4-6,0.

Abb. 58 (S. 141) zeigt nahezu das gleiche Aminosäurespektrum wie der WT in der späten exponentiellen Phase (Abb. 57, S. 140). Die zwei dargestellten Mutanten unterscheiden sich nur geringfügig in der Höhe der Peaks für Ala, Gly und Glu. Die in den Abbildungen 58 (S. 141) und 59 (S. 142) gezeigten Chromatogramme stehen stellvertretend für ähnliche Chromatogramme der insgesamt 50 vermessenen Mutanten der Stichprobe, in denen ebenfalls nur die drei Aminosäuren Ala, Gly und Glu in leicht variierender Höhe vorkommen.

Ein Unterschied zwischen einigen Mutanten der Stichprobe, der auf das Vorliegen einer Mutation hindeutet, ist in Abb. 59 (S. 142) zu erkennen, in welcher bei zwei exemplarisch ausgewählten Mutanten der Glu-Peak vollständig fehlt.

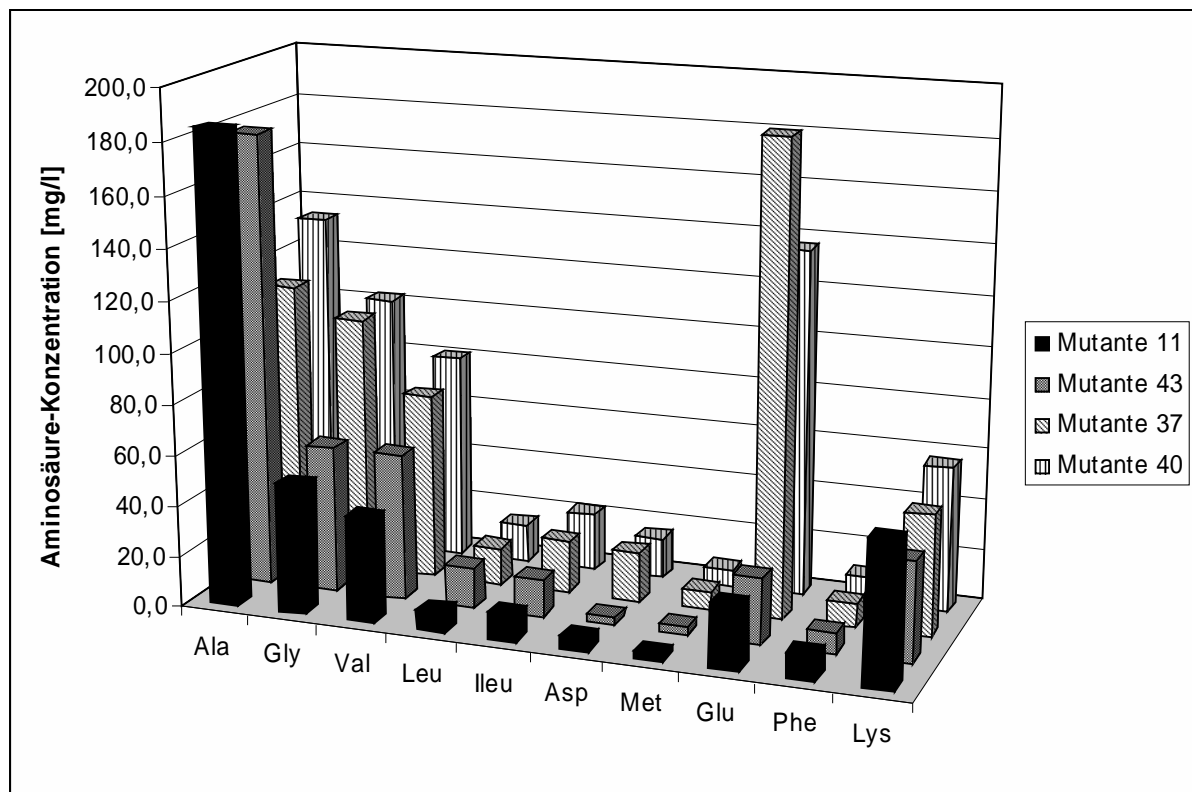


**Abb. 59:** Aminosäurespektrum zweier Mutanten bei unterschiedlichen Extinktionen innerhalb der exponentiellen Phase des Wachstums<sub>2</sub>. In schwarz Mutante 10 im Extinktionsbereich der 1. Gruppe von 6,2-7,0; in rot Mutante 36 im Extinktionsbereich der 2. Gruppe von 5,4-6,0.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stichprobe von 50 Mutanten in der exponentiellen Phase keine nennenswert erhöhten Aminosäurekonzentrationen gegenüber dem Wildtyp DSM 20300 zeigt, weder im Fall der Aminosäure Methionin noch bei anderen Aminosäuren des Spektrums. Darüber hinaus sind auch keine bedeutenden Unterschiede in den Aminosäurespektren der Mutanten bei den zwei verschiedenen Extinktionsbereichen 5,4-6,0 und 6,2-7,0 zu erkennen gewesen.

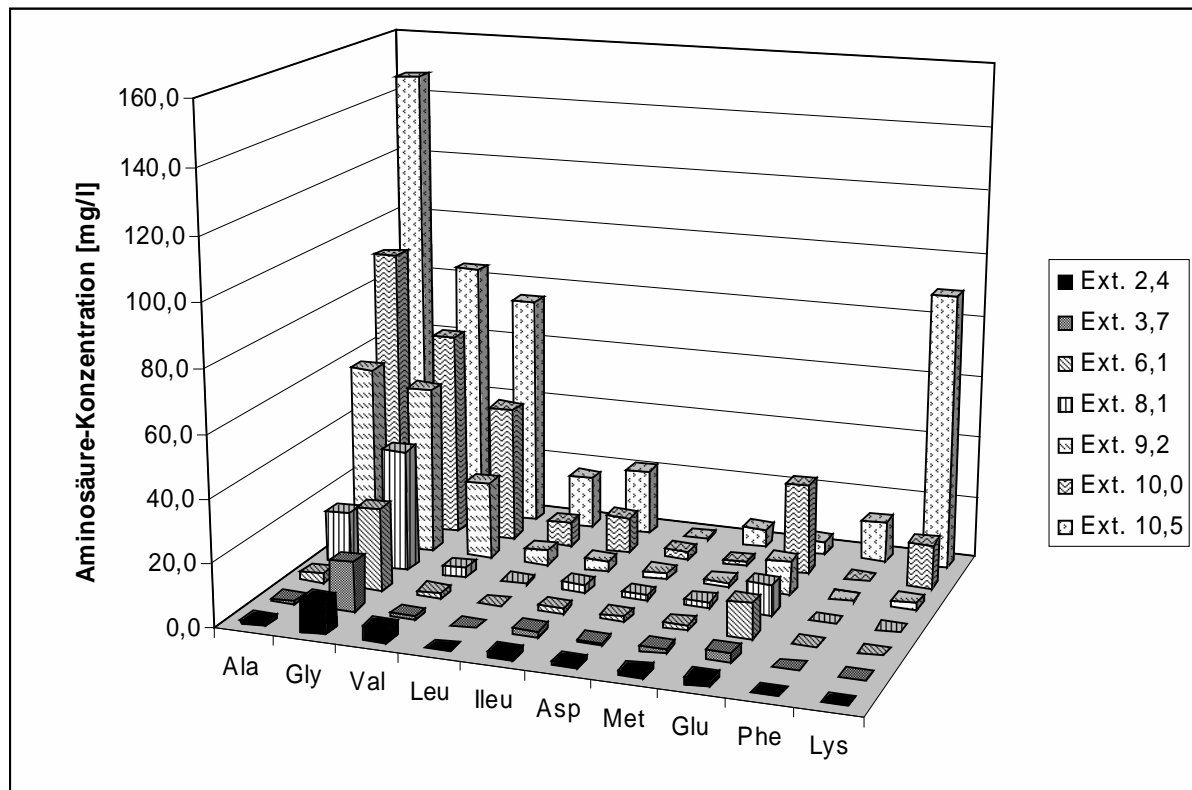
### 5.4.2 Untersuchungen zur stationären Phase

Da die Stichprobe in Abschnitt 5.4.1 aus 50 Mutanten wenig Variation im Aminosäurespektrum zeigte, erschien es sinnvoll, auch die stationäre Phase einiger Mutanten im Vergleich zur Stationärphase beim Wildtyp zu untersuchen (Abb. 60, S. 143 und Abb. 61, S. 144).



**Abb. 60:** Aminosäurespektrum von 4 Mutanten in der stationären Phase des Wachstums mit einer Extinktion<sub>550</sub> von >10 einer 96 well Kultivierung in MM2\_2-Medium (Versuchsdurchführung siehe 5.3.2.b)

Die Mutanten 11 und 43 zeigten gegenüber dem Wildtyp DSM 20300 ein erhöhtes Ala-Level. Bei Mutante 11 wurde mehr Lysin (Lys) gebildet, bei Mutante 37 sind die Konzentrationen an Isoleucin (Ileu) und Gly gegenüber dem Wildtyp erhöht. Bei der Mutante 40 ist die Aminosäurekonzentration von Glutaminsäure, Isoleucin und Lysin etwas erhöht.



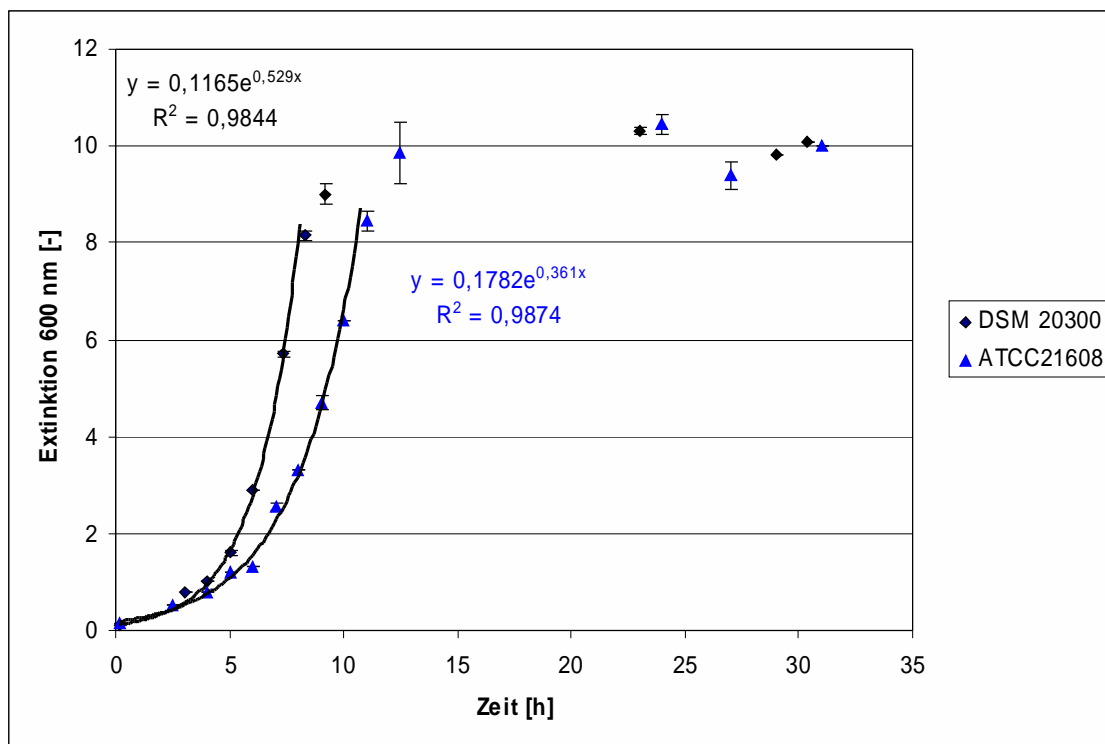
**Abb. 61:** Aminosäurespektrum des Wildtyps von *C. glutamicum* DSM 20300 im Verlauf einer im Kolben-Doppelansatz aufgenommenen Wachstumskurve; die Extinktion wurde bei 600 nm gemessen; Versuchsablauf: 100 ml Schikane-Kolben mit 20 ml Befüllung; 18 ml MM2\_2 + 2 ml VK einer Extinktion<sub>600</sub> von 1; Inkubation 30 °C 180 rpm; Messpunkte nach 5, 6, 7, 8, 9, 10 und 24 h.

Aus der Abb. 61 (S. 144) ist zu entnehmen, dass bis auf Asparaginsäure (Asp) alle anderen gezeigten Aminosäuren mit Zunahme der Biomasse auch höhere Aminosäurekonzentrationen bilden. Beim WT sind in der Stationärphase bei einer Extinktion<sub>600</sub> von > 10,0 vor allem die Konzentrationen von Ala, Gly, Val und Lys stark erhöht. Selbst die Met-Konzentration ist in der Stationärphase gegenüber der exponentiellen Phase erhöht, auch wenn das Level < 10 mg/l verbleibt. Gemäß diesen Ergebnissen könnte es sein, dass kein Met-Überproduzent beim Screening gefunden wurde, weil der Stamm nicht lang genug in Vor- und Hauptkultur inkubiert wurde, um nachweisbare Mengen an Met gebildet zu haben.



### 5.4.3 Momentaufnahmen des Aminosäurespektrums von ATCC 21608 in MM2\_2 in der exponentiellen und stationären Phase

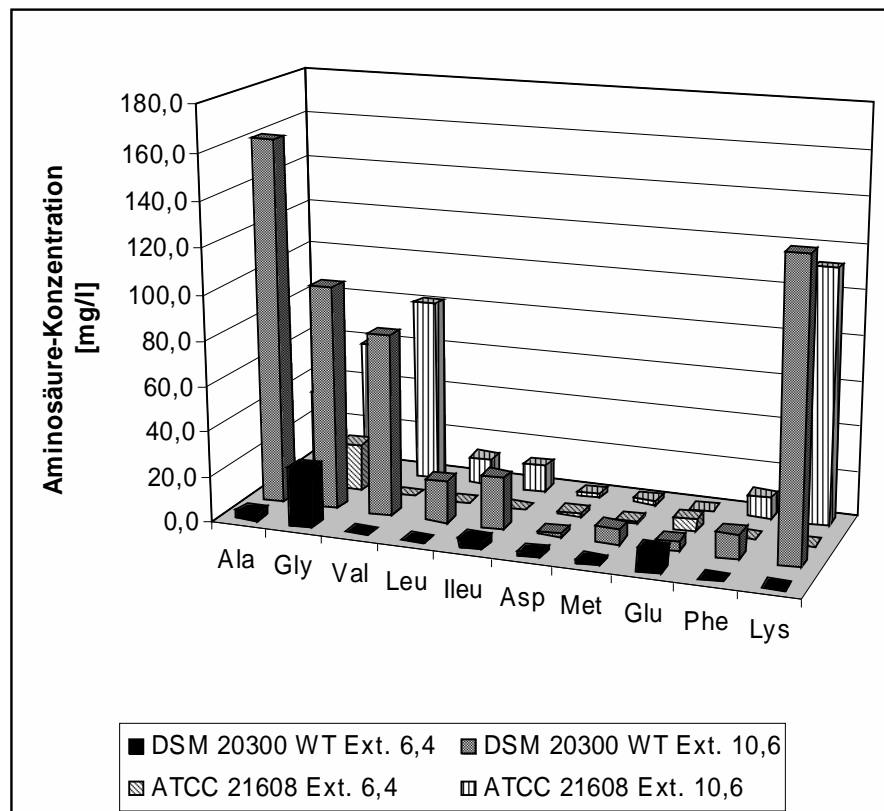
Bei dem Stamm *C. glutamicum* ATCC 21608 handelt es sich um einen Patentstamm, der laut Angabe des Patents von Nakayama (Nakayama et al., 1971) nach einer 72 h Inkubation 3,4 g/l Met in der Kulturbrühe enthält, von denen nach Abtrennung der Zellen und übrigen Feststoffe mit Hilfe eines Ionenaustauschverfahrens 1,9 g/l Met-Ausbeute erzielt werden konnten. Der Stamm ist eine Mutante des Stammes ATCC 13032 (DSM 20300). Es ist anzumerken, dass das von Nakayama verwendete Fermentationsmedium einen Anteil von 0,5 % enzymatisch abgebauten Caseins enthielt. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob der Stamm ATCC 21608 in dem optimierten MM2\_2-Medium die im Patent vorgestellten Ausbeuten an Met erzielen kann. Dazu wurden Wachstumskurven in MM2\_2 aufgenommen und zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums in der exponentiellen und stationären Phase zellfreie Proben per GC auf Met-Bildung analysiert (Abb. 62, S. 145).



**Abb. 62:** Wachstumskurve von *C. glutamicum* ATCC 21608 und *C. glutamicum* DSM 20300 in MM2\_2; jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus 2 Extinktionswerten. Ein Doppelansatz der Hauptkultur wurde mit 10 % einer MM2\_2-Vorkultur mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 1,5 inokuliert. Die Inkubation erfolgte in 100 ml Schikanekolben mit einer Befüllung von 20 ml bei 30 °C und 180 rpm.

Der Wachstumsverlauf von ATCC 21608 und DSM 20300 ist in MM2\_2 unter den in der Bildunterschrift beschriebenen Bedingungen nahezu identisch bis auf den etwas langsameren Übergang von ATCC 21608 zur exponentiellen Phase.

Die Aminosäurespektren vom Wildtyp DSM 20300 und ATCC 21608 wurden bei einer Extinktion von 6,4 und 10,6 in Abb. 63 (S. 146) gegenübergestellt.



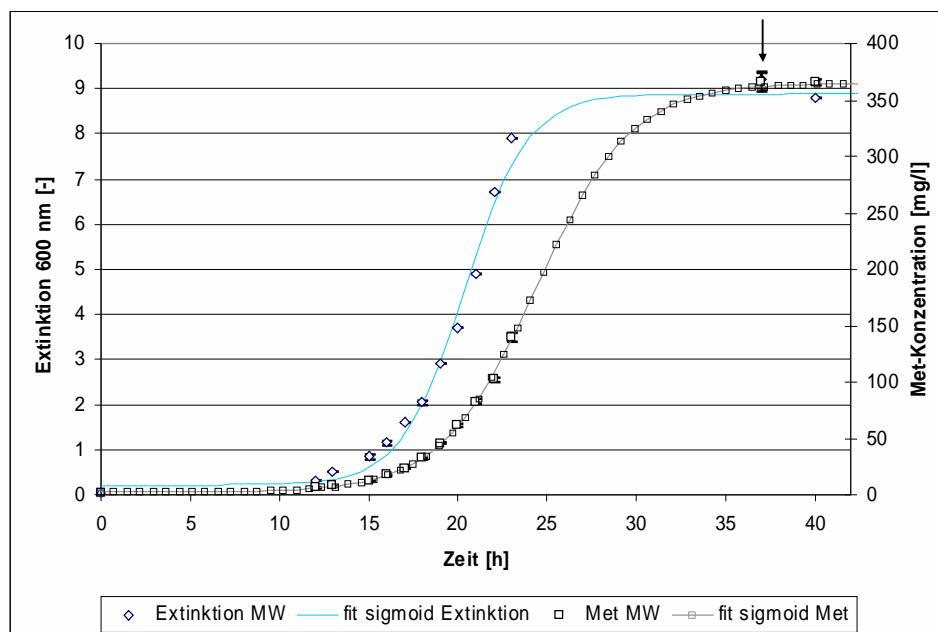
**Abb. 63:** Aminosäurespektrum von *C. glutamicum* DSM 20300 Wildtyp (WT) und ATCC 21608 zu zwei Messzeitpunkten einer im Kolben-Doppelansatz aufgenommenen Wachstumskurve in MM2\_2.

Es ist deutlich zu erkennen, dass ATCC 21608 weder in der exponentiellen noch in der stationären Phase Methionin überproduziert hat. Insgesamt sind die Messwerte des Aminosäurespektrums sogar etwas niedriger als die des Wildtyps bei vergleichbarer Extinktion. Damit konnten die Ergebnisse des Patents von Nakayama in MM2\_2 nicht reproduziert werden. Auch der Versuch, den Stamm ATCC 21608 in einem komplexen Medium zur Met-Bildung anzuregen, schlug fehl (Daten nicht gezeigt), es konnte nur das Met gemessen werden, das durch die komplexen Mediumsbestandteile in das Medium eingesetzt

worden waren. Neben dem Patent von Nakayama war die Arbeit von Pham interessant, in welcher ebenfalls mit der Mutante ATCC 21608 Met-Ausbeuten von ca. 3,5 g/l nach 72-96 h Kultur erzielt werden konnten (Pham, C.B. et al., 1992). Das Fermentationsmedium von Pham enthielt als komplexe Mediumbestandteile 20 g/l Maisquellwasser und wurde mit Kokosnusswasser angereichert. Die Arbeiten von Pham und Nakayama verlangen nach einer kritischen Prüfung, da die Methodik des Met-Nachweises zum einen der Nitroprussiat-Test (Pham, C.B. et al., 1992) zum anderen nicht bekannt gemacht ist (Nakayama et al., 1971). Der Nitroprussiat-Test für den Met-Nachweis ist nicht vollkommen eindeutig, das Ergebnis wird durch Nebenreaktionen mit anderen im Gemisch enthaltenen Aminosäuren verfälscht, vor allem durch Glycin (Hess, W.C. and Sullivan, M.X., 1943; Horn, M.J. et al., 1946; McCarthy, T.E. and Sullivan, M.X., 1941).

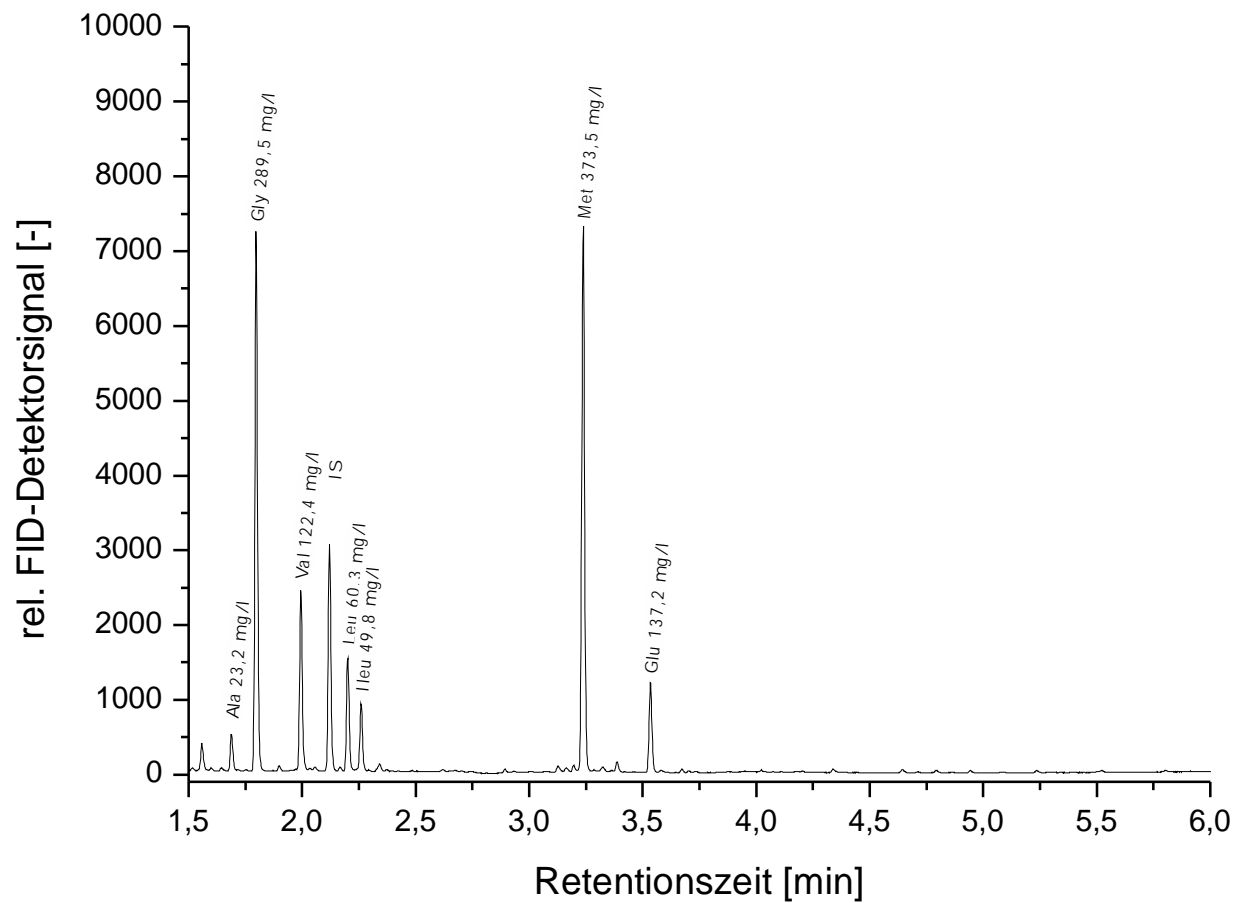
#### 5.4.4 Untersuchung eines potenziellen industriellen Produktionsstammes für Met

Um die Qualität des optimierten MM2\_2 Mediums und der GC-Analytik in der Praxis zu testen, wurde ein potenzieller industrieller Produktionsstamm für Methionin (Met) hinsichtlich seines Wachstums, der Met-Bildung und des Aminosäurespektrums untersucht.



**Abb. 64:** Wachstumskurve und Met-Bildung eines potenziellen industriellen Produktionsstammes für Methionin. 20 ml MM2\_2 wurden im Doppelansatz in 100 ml Schikane-Kolben mit jeweils 2 ml einer in MM2\_2 hergestellten VK einer Extinktion<sub>600</sub> von 0,5 angeimpft; Inkubation: 32 °C; 180 rpm; Versuchsdauer 40 h. Die Untersuchung erfolgte durch Extinktionsmessung und GC-Analytik.

Abb. 64 (S. 147) zeigt die Wachstumskurve des Stammes und die parallel dazu aufgenommene Met-Bildung. Es konnte festgestellt werden, dass das MM2\_2 Medium bestens für das Wachstum und die Met-Bildung des Produktionsstammes geeignet war. Die Untersuchung dieses Stammes kann als Positivkontrolle für die Qualität des MM2\_2 Mediums und die Met-Analytik per GC gewertet werden. Es ist eine hohe Reproduzierbarkeit in unabhängig voneinander untersuchten Kolben-Doppelansätzen gegeben. Sowohl die Met-Bildung (Abb. 64, S. 147)) als auch die Bildung anderer Aminosäuren (Daten nicht gezeigt) verläuft wachstumsgekoppelt mit einer leichten zeitlichen Verzögerung der Aminosäure-Bildung gegenüber der Zunahme des Wachstums. Sobald die Extinktion stagniert oder sinkt, verringert sich auch die gebildete Met-Menge. Scheinbar wird das zuvor gebildete Met ab der Stationärphase von den Zellen verstoffwechselt (Daten nicht gezeigt). Trotz fehlender Messpunkte zwischen 23 und 37 h Inkubationsdauer ist der vermutliche Kurvenverlauf von Extinktion und Met-Bildung dem sigmoidalen fit der Abb. 64 (S. 147) zu entnehmen. Der Pfeil in Abb. 64 (S. 147) markiert den 37 h Messpunkt, an welchem ein komplettes Aminosäurespektrum in der Abb. 65 (S. 149) gezeigt ist. Es soll einen Überblick über die Verteilung der Aminosäuren gegen Ende der exponentiellen Phase des Wachstums bei einer Extinktion<sub>600</sub> von 8,8 geben. In dieser Momentaufnahme sind die Hauptprodukte des untersuchten Stammes Met und Gly.



**Abb. 65:** Aminosäurespektrum einer HK-Probe nach GC-Vermessung mit einer Extinktion<sub>600</sub> von 8,8 zum Zeitpunkt 37 h.

Während im Originalmedium gemäß Herkunft des Stammes nur Met-Ausbeuten von ca. 40 mg/l erzielt wurden, konnte das Ergebnis in dem in dieser Arbeit entwickelten MM2\_2 Medium mit knapp 400 mg/l Met nahezu verzehnfacht werden.

## 6 Zusammenfassung

### Literaturrecherche

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Methionin (Met)-Produktion beim Wildtyp und bei Mutanten von *C. glutamicum* DSM 20300 untersucht werden. Die Literaturrecherche (siehe S. 16-18) ergab falsche Schwefel-Bilanzen in Nährmedien, die in der Vergangenheit zur Met-Überproduktion eingesetzt wurden. Da mit diesen Medien angeblich Met-Ausbeuten von mehr als 10 g/l erzielt wurden, was laut Schwefel-Gehalt unmöglich ist, wurde klar, wie wichtig eine verlässliche Aminosäure-Analytik für ein Screening nach Met-Überproduzenten ist. Keines der in dieser Arbeit im Review der Literatur vorgestellten Ergebnisse mit hohen Met-Ausbeuten und angewandter Met-Analoga-Selektionsstrategie konnte reproduziert werden. Selbst wenn der Schwefel im eingesetzten Medium für eine Met-Überproduktion ausreichend war, muss in vielen Fällen die Met-Analytik angezweifelt werden, z.B. bei der Arbeit mit dem Patentstamm ATCC 21608. Die im Patent publizierten Met-Ausbeuten konnten weder im dort angegebenen Medium noch in MM2\_2 reproduziert werden. Die Met-Bildung lag genau wie beim Wildtyp und allen getesteten Mutanten von DSM 20300 in einem Konzentrationsbereich von 1-3 mg/l Met in Abhängigkeit von der erzielten BTM.

### Analytik

Ziel der Optimierung von GC-Analytik und der Entwicklung eines mikrobiologischen Tests war die Erarbeitung einer schnellen und präzisen Methionin (Met)-Analytik im Hochdurchsatz. Bei Anwendung des EZ:faast-Kits und durch ineinander verschachtelte Arbeitsvorgänge bei der Derivatisierung parallel zur GC-Messung dauert die Analyse einer Probe von der Derivatisierung bis zum Vorliegen des GC-Chromatogrammes im Durchschnitt maximal 20 min. Damit ist die GC-Analytik schneller, empfindlicher und erzielt eine höhere Trennschärfe als eine vergleichbare HPLC-Analytik, aber sie ist für ein Hochdurchsatz-Screening noch immer zu langsam und mit Material-Kosten von etwa 5 €/je Probe zu teuer. Sowohl die Derivatisierung als auch die GC-Analytik wurden im Rahmen dieser Arbeit optimiert, da sie der späteren Kontrolle der Ergebnisse des entwickelten Schnell-Tests für Met und der Charakterisierung Met-positiver Stämme dienen sollte. Störpeaks im

Chromatogramm, vor allem im Bereich der Aminosäure Met, wurden durch Optimierung minimiert, so dass Met in einer Konzentration von 1 mg/l mühelos nachweisbar war. Im Hinblick auf die Etablierung eines Hochdurchsatzscreenings nach Met-Überproduzenten sollte die Analysendauer je Probe unter Beibehaltung der hohen Trennleistung und guten Reproduzierbarkeit verkürzt werden. Es wurde mit zwei Temperaturrampen gearbeitet: 1) 35 °C/min von 110-250 °C und 2) 30 °C/min von 250-330 °C; am Ende jeder Messung wurde die Säule 4 min bei 330 °C ausgeheizt. Außerdem wurde die Flussrate unter Einhaltung der Gesetzmäßigkeit der Van Deemter Gleichung erhöht. Um die Derivatisierung und die Vermessung der Derivate reproduzierbar zu machen, wurden die Derivate im Autosampler auf 4 °C gekühlt und die Proben nur maximal dreimal gemessen. Bei Bearbeitung salzhaltiger Proben wurden diese vor Derivatisierung entsprechend verdünnt, um die Bindung der Aminosäuren an den Ionenaustauscher zu gewährleisten. Gepufferte Proben wurden bis auf einen pH-Wert von 2 angesäuert, damit das Gemisch aus Probe und Reagenz 1 im 1. Schritt der Derivatisierung den erforderlichen pH-Wert zwischen 1,5-6 ergab.

Die hohe Qualität und Einsatzbereitschaft des optimierten MM2\_2 Mediums und der optimierten GC-Analytik für Met konnte anhand der Untersuchung eines potenziellen industriellen Produktionsstammes für Met unter Beweis gestellt werden. Während im Originalmedium gemäß Herkunft des Stammes nur Met-Ausbeuten von ca. 40 mg/l erzielt werden konnten, lag die Ausbeute in MM2\_2 Medium bei knapp 400 mg/l. Das MM2\_2 Medium und die in dieser Arbeit für Met vorgestellte GC-Analytik ist einsatzbereit für eine Fortsetzung der Forschung bezüglich eines Hochdurchsatz-Screenings nach Met-Überproduzenten.

### Hochdurchsatz-Screening

Aus verschiedenen Literaturstellen ist bekannt, dass beim Screening nach Met-Überproduzenten oftmals die Met-Analoga-Selektionsstrategie zur Anwendung kam. Die Methode konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden, vielmehr wurde sie aus verschiedenen Gründen als unbrauchbar und überflüssig verworfen, da aufgrund vorliegender Daten anzuzweifeln ist, dass der Einsatz von Met-Analoga bei der Suche nach Met-Überproduzenten überhaupt zum Erfolg führen kann. Da selbst der Wildtyp von DSM 20300 über eine ausgeprägte Resistenz gegenüber den Met-Analoga verfügt und durch Adaptation resistent gegenüber höheren Met-Analoga-Konzentrationen gemacht werden kann, sind die

Analoga zu unselektiv, um mögliche Met-überproduzierende Mutanten vom Wildtyp zu unterscheiden. Der hohe Zeit- und Materialaufwand bei z.T. sehr hohen Beschaffungs- oder Entsorgungskosten steht in keinem angemessenen Verhältnis zum Nutzen der Methode. Darüber hinaus sind die Analoga sehr giftig, wodurch die Vertriebsfirmen für z.B. Ethionin noch nicht einmal für einen Forschungszeitraum von drei Jahren eine ausreichende Verfügbarkeit der Substanz gewährleisten konnten. Da es sich bei der Met-Analoga-Selektionsstrategie lediglich um eine Vorselektion von möglicherweise Met-überproduzierenden Mutanten handelte, wurde die Strategie durch die Entwicklung eines mikrobiologischen Tests zum Met-Nachweis ersetzt.

Der mikrobiologische Test wurde als eine kostengünstige Alternative zur GC-Analytik entwickelt, um den Durchsatz an gescreenten Mutanten deutlich erhöhen zu können mit einhergehender Automatisierbarkeit der verschiedenen Arbeitsschritte durch einen Roboter. Die Methode basiert auf dem Met-auxotrophen *E. coli*-Stamm B834, dessen Wachstumsverhalten von der im Medium vorhandenen Met-Konzentration abhängig ist. Mittels Photometrie kann die Optische Dichte (OD) der *E. coli*-Zellsuspension pro Zeiteinheit mit der durch einen anderen Organismus (in diesem Fall *C. glutamicum* DSM 20300-Mutanten) gebildeten Met-Menge korreliert werden. In der Standardprozedur ist ein sicherer Nachweis ab ca. 10 mg/l Met im 96 well Maßstab bei einer Inkubation von 6 h, 35 °C und 1100 rpm möglich. Je nach Verhältnis von Gesamtvolumen zur unbekannten Lösung lässt sich der zu vermessende Met-Konzentrationsbereich einstellen. Der Vorteil des Tests im 96 well Maßstab liegt in der Automatisierbarkeit. Zahlreiche Schritte von der UV-Mutation über die Kultivierung der Mutanten bis hin zum mikrobiologischen Met-Nachweis durch *E. coli* B834 könnten durch einen Screening-Roboter ausgeführt werden. Der Zeitbedarf für die Vermessung einer *E. coli* Test-Probe auf Met ist gering, da mit Hilfe eines Spektralphotometers für 96 well Platten in weniger als 10 sek die Extinktion von 96 Proben gemessen wird. Ohne weitere Automatisierung überprüft ein Mitarbeiter visuell, ob bei definierter Met-OD-Korrelation ein Met-Überproduzent unter den 96 vermessenen Proben ist. Der mikrobiologische Test wurde evaluiert und statistisch abgesichert. Schwachstellen des Tests wurden im Rahmen der Entwicklung und Anpassung an verschiedene Wachstumsmedien und die Vermessung wässriger Standards und zellfreier Überstände beseitigt. In MM2\_2-Medium ist lediglich ein Schnelltest auf Met mit einer Ja/Nein-Entscheidung ab z.B. 10 mg/l entwickelt worden. In B74- und MM1-Medium dagegen



konnten sehr genau arbeitende Kalibrierkurven für Bereiche von 0-200 mg/l Met erstellt werden. In dieser Arbeit wurde nach der Medienoptimierung für *C. glutamicum* DSM 20300 nur noch in MM2\_2 gearbeitet und der daran angepasste *E. coli* Test für das Screening nach Met-Überproduzenten eingesetzt. Die zuvor in anderen Medien entwickelte *E. coli*-Testprozedur ist allerdings für andere Anwendungen denkbar, wenn es z.B. um die schnelle Vermessung zahlreicher wässriger Met-Standards geht, ohne eine teure und zeitaufwendige GC- oder HPLC-Analytik einsetzen zu wollen.

Der Zeitbedarf für die Herstellung von UV-Mutanten mit anschließender Platten-Inkubation beträgt ca. 3 Tage; für die Kultivierung der Mutanten in Form einer Vor- und Hauptkultur mit anschließender Vermessung im *E. coli* Test ist ein Zeitbedarf von weiteren 3 Tagen nötig. Bei Nutzung von zwei 4-Platten-Thermoshakern und der Arbeitskraft eines Mitarbeiters können in einem Monat bei entsprechender Laborausstattung ca. 6000 Proben im Screening vollständig von der Mutation bis zur Vermessung der Mutanten auf Met bearbeitet werden. Für eine qualitätssichernde GC-Analytik ist weiterer Zeitbedarf einzuplanen. Trotz routinierter Anwendung der Screening-Prozedur und der Vermessung von mehr als 20.000 Mutanten auf Met-Bildung wurde kein Überproduzent gefunden. Allerdings wurden nur Mutanten in der exponentiellen Phase des Wachstums betrachtet. Aus Zeitgründen wurden langsam wachsende Mutanten und Mutanten in der Stationärphase im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht; sie fielen durch das angelegte Screening-Raster, da Zell-Lyse den für die exponentielle Phase entwickelten Test verfälscht. Auch auxotrophe Mutanten wurden im entwickelten minimalen Screening- und Produktionsmedium MM2\_2 nicht erfasst.

## 7 Ausblick

Eine Optimierung der Methioninproduktion in *C. glutamicum* DSM 20300 durch UV-Mutation basierend auf Erkenntnissen dieser Arbeit zur Screening-Prozedur nach Met-Überproduzenten wird angestrebt. Trotz gut funktionierender Methodik konnte kein Met-Überproduzent gefunden werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass aus Zeitgründen bei der Entwicklung der Methode nur Zellen in der exponentiellen Phase des Wachstums untersucht wurden. Die Strategieentwicklung und vor allem ihre statistische Absicherung standen im Vordergrund, wobei Zell-Lyse und damit der Eintritt in die Stationärphase vermieden wurden, da diese den *E. coli* Test verfälscht hätten. Für ein Schnell-Screening wäre es zu zeitaufwendig gewesen, einzelne langsam wachsende Mutanten zu erhalten und weiter zu bearbeiten, wenn der Großteil der Mutanten schnellwüchsig ist.

Es stellte sich die Frage, wie die Screening-Strategie verändert werden könnte, um langsam wachsende Mutanten und Mutanten in der Stationärphase mit dem *E. coli* Test verlässlich zu vermessen. Außerdem erscheint auch die Untersuchung von Lysin- und Threonin-auxotrophen Mutanten sinnvoll.

Um z.B. Lysin- und Threonin-auxotrophe Mutanten zu erfassen, bei denen die Chance auf vermehrte Met-Bildung gegeben ist, müsste lediglich das Screening- und Produktionsmedium neben minimalen Bestandteilen zusätzlich Lysin und Threonin enthalten, die Screening-Strategie könnte -wie in dieser Arbeit vorgestellt- beibehalten werden. Mit zunehmender Erfahrung bei der Arbeit mit Mutanten erscheint es außerdem aussichtsreich, solche Mutanten näher auf Met-Bildung zu untersuchen, die besonders langsam wachsen. Sehr wahrscheinlich haben Met-Überproduzenten Stoffwechseldefekte, die die Wachstumsgeschwindigkeit reduzieren. Wichtige Ansätze zur Veränderung der Screening-Strategie wären zum einen verlängerte Inkubationszeiten für die Mutanten, zum anderen eine Verdünnung des zellfreien Überstandes, um die negativen Auswirkungen zell-lytischer Produkte auf den *E. coli* Test zu minimieren. Problematisch bei einer Verdünnung ist, dass nicht nur die störenden z.B. zell-lytischen Bestandteile der Probe sondern auch die Met-Konzentration verdünnt wird; die Schwelle für das Auffinden eines Met-Überproduzenten wird so je nach Verdünnungsgrad erhöht. Es ergeben sich dadurch zwar Grenzen in der manuellen Pipettierbarkeit von Kleinstvolumen, die aber bei Einsatz von Robotersystemen behoben werden können. Es existieren derzeit Pipettiersysteme für die Pipettierung von Kleinstvolumina zwischen 50 Nanoliter und 8 Mikroliter mit 4, 8 oder 16 Dosierkanälen gleichzeitig (Zinsser Analytic).

Die in dieser Arbeit vorgestellte Screening-Prozedur könnte angepasst werden, indem z.B. die Mutanten-Vorkultur pauschal 48 h inkubiert wird, um langsam wachsenden Mutanten die Gelegenheit zum Anwachsen zu geben. Die folgende Hauptkultur könnte wachstumsabhängig bis zu einer Extinktion<sub>550</sub> von 6,0-8,0 (späte exponentielle Phase) inkubiert werden. Eine automatisierte Extinktionsprüfung durch einen Roboter wäre an dieser Stelle hilfreich, um nur das Wachstum von Zellsuspensionen mit geeignet hoher Extinktion abzustoppen und im *E. coli* Test weiterzubearbeiten. Eine Extinktion<sub>550</sub> von 6,0-8,0 bei langsam wachsenden Mutanten müsste ausreichend sein, um die Met-Bildung eines Met-Überproduzenten zu erkennen, da es sich sehr wahrscheinlich um eine wachstumsgekoppelte allmähliche Anreicherung von Met handelt. Eine Verkürzung der Inkubation der Vorkultur um einige Stunden wäre möglich, wenn für die Beimpfung der Vorkultur noch von der Platten-Inkubation 30 °C warme, frisch hergestellte Mutanten-Einzelkolonien eingesetzt würden anstelle von 4 °C kalten Einzelkolonien.

Bei Umsetzung der hier vorgeschlagenen Strategie-Veränderungen und gleichzeitiger Erfassung Lysin- und Threonin-auxotropher Mutanten dürfte die Erfolgsaussicht für das Auffinden eines Met-Überproduzenten innerhalb einer Population von langsam wachsenden Mutanten gegenüber einer Zellpopulation mit schnellwüchsigen Zellen in der exponentiellen Phase stark erhöht sein.

Zusammenfassend betrachtet kann die in dieser Arbeit vorgestellte Screening-Strategie leicht auf andere Aminosäuren und Produkte des Stoffwechsels übertragen werden. Zwei Veränderungen müssen mit der Anpassung einhergehen: Nutzung eines geeigneten auxotrophen Organismus für das gewünschte Produkt mit Erstellung von dazugehörigen Kalibrierkurven und die Anpassung des Screening- und Produktionsmediums.

## 8 Literatur

- Adams, J.M. and Capecchi, M.R.** (1966) N-Formylmethionyl-Srna As Initiator of Protein Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55** (1): 147-155.
- Alfoldi** (1958) La Production induite de mégacine en milieu synthétique. *Annales de l'Institut Pasteur* **94** (4): 474-484.
- Baek, I.-G.** (1999) Analytik von Aminosäuren und biogenen Aminen in fermentierten Lebensmitteln mittels HPLC und GC. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Giessen. 1-180.
- Banik, A.K. and Majumdar, S.K.** (1974) Studies on Methionine Fermentation .1. Selection of Mutants of Micrococcus-Glutamicus and Optimum Conditions for Methionine Production. *Indian Journal of Experimental Biology* **12** (4): 363-365.
- Banik, A.K. and Majumdar, S.K.** (1975a) Induction of Nutritional Mutants of Micrococcus-Glutamicus and Their Amino-Acid Accumulation. *Folia Microbiologica* **20** (1): 38-45.
- Banik, A.K. and Majumdar, S.K.** (1975b) Effect of Mineral Elements on Production of Threonine by Micrococcus-Glutamicus. *Acta Microbiologica Polonica Series B-Microbiologia Applicata* **7** (1): 25-29.
- Banik, A.K. and Majumdar, S.K.** (1975c) Effects of Minerals on Production of Methionine by Micrococcus-Glutamicus. *Indian Journal of Experimental Biology* **13** (5): 510-512.
- Barksdale, L.** (1970) Corynebacterium diptheriae and its relatives. *Bacteriol. Rev.* **34** 378-422.
- Bradford, M.M.** (1976) Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1-2): 248-254.
- Cantoni, G.L.** (1953) S-Adenosylmethionine - A New Intermediate Formed Enzymatically from L-Methionine and Adenosinetriphosphate. *Journal of Biological Chemistry* **204** (1): 403-416.
- Chattapadhyay, M.K., Sengupta, D., and Sengupta, S.** (1995) Fermentative production of methionine by 5-bromuracil resistant mutants of Escherichia coli K-12. *Med. Sci. Res.* **23** 775-775.

- Chibata J., Tosa T., Sato T., and Mori T.** (1976) Production of L-amino acids by aminocyclase adsorbed on DEAE-Sephadex. 746-759.
- Collins, M.D. and Cummings, C.S.** (1986) Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sherpe & J.G. Holt, (Herausgeber) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Band 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 1266-1276.
- Davis, B.D. and Mingioli, E.S.** (1950) Mutants of *Escherichia-Coli* Requiring Methionine Or Vitamin-B12. *Journal of Bacteriology* **60** (1): 17-28.
- Deutenberg, D.** (2003) Genetische Optimierung der Methioninproduktion in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Diplomarbeit. Fakultät Biologie Universität Bielefeld. 1-110.
- Eggeling L. and Bott M.** (2005) Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. **1** 1-616.
- Eggeling, L. and Sahm, H.** (1999) L-Glutamate and L-lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (2): 146-153.
- Enei H., Shibai H., and Hirose Y.** (1985) 5` - guanosine monophosphate. In M. Moo-Young, (Herausgeber) *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Oxford. 653-658.
- Gomes, J. and Kumar, D.** (2005) Production of L-methionine by submerged fermentation: A review. *Enzyme and Microbial Technology* **37** (1): 3-18.
- Greenstein, J.P. and Winitz, M.** (1961) Methionine. In: Chemistry of the Amino Acid, Vol. 3, John Wiley & Sons. 2125-2155.
- Hauer, B., Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Keßeler, M., Stürmer, R., and Zelinski, T.** (2004) Industrielle Chemie: Aufsätze - Industrielle Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven Zwischenprodukten. *Angewandte Chemie* **116** 806-843.
- Hermann, T.** (2003) Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* **104** (1-3): 155-172.
- Hess, W.C. and Sullivan, M.X.** (1943) The cysteine, cystine, and methionine content of proteins. *J. Biol. Chem.* **151** 635-642.
- Horn, M.J., Jones, D.B., and Blum, A.E.** (1946) Colorimetric Determination of Methionine in Proteins and Foods. *Journal of Biological Chemistry* **166** (1): 313-320.

**Hüser, A.T., Becker,I., Dondrup,M., Kalinowski,J., Plassmeier,J., and et al.** (2003) Development of a *Corynebacterium glutamicum* DNA microarray and validation by genome-wide expression profiling during growth with propionate as carbon source. *J. Biotechnol.* **106** 269-286.

**Hwang, B.J., Kim,Y., Kim,H.B., Hwang,H.J., Kim,J.H., and Lee,H.S.** (1999) Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: Isolation and analysis of metB encoding cystathionine gamma-synthase. *Molecules and Cells* **9** (3): 300-308.

**Hwang, B.J., Yeom,H.J., Kim,Y., and Lee,H.S.** (2002) *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *Journal of Bacteriology* **184** (5): 1277-1286.

**Kalinowski, J. et al.** (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104** (1-3): 5-25.

**Kase, H. and Nakayama,K.** (1975b) Isolation and characterisation of S-adenosylmethionine requiring mutants and role of S-adenosylmethionine in the regulation of methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **39** (1): 161-168.

**Kase, H. and Nakayama,K.** (1975a) Fermentation production of L-methionine and regulation of L-methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* .3. L-Methionine production by methionine analog-resistant mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *Agr. Biol. Chem.* **39** (1): 153-160.

**Keilhauer, C., Eggeling,L., and Sahm,H.** (1993) Isoleucine Synthesis in *Corynebacterium-Glutamicum* - Molecular Analysis of the Ilvb-Ilvn-Ilvc Operon. *Journal of Bacteriology* **175** (17): 5595-5603.

**Kim, J.W., Kim,H.J., Kim,Y., Lee,M.S., and Lee,H.S.** (2001) Properties of the *Corynebacterium glutamicum* metC gene encoding cystathionine beta-lyase. *Molecules and Cells* **11** (2): 220-225.

**Kinoshita, S., Udaka,S., and Shimono,M.** (1957) Amino acid fermentationi. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Appl. Microbiol.* **3** 193-205.

**Kircher, M. and Leuchtenberger,W.** (1998) Aminosäuren - ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie. in unserer Zeit* **28** (5):

**Kirchner, M.** (1998) Amino Acids as feed additives. *Society ind. Microbiol.* **48** (1): 4-11.

**Krömer, J.O.** (2006) Systembiotechnologische Studien an *Corynebacterium glutamicum* zur Charakterisierung der Methioninsynthese. Dissertation. Naturwissenschaftlich-technische Fakultät III Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der Universität des Saarlandes.182.

**Kumar, D., Garg,S., Bisaria,V.S., Sreekrishnan,T.R., and Gomes,J.** (2003) Production of methionine by a multi-analogue resistant mutant of *Corynebacterium lilium*. *Process Biochem.* **38** (8): 1165-1171.

**Kumar, D. and Gomes,J.** (2005) Methionine production by fermentation. *Biotechnology Advances* **23** (1): 41-61.

**Kumar, D., Subramanian,K., Bisaria,V.S., Sreekrishnan,T.R., and Gomes,J.** (2005) Effect of cysteine on methionine production by a regulatory mutant of *Corynebacterium lilium*. *Bioresource Technology* **96** (3): 287-294.

**Lederberg, J. and Lederberg,E.M.** (1952) Replica Plating and Indirect Selection of Bacterial Mutants. *Journal of Bacteriology* **63** (3): 399-406.

**Lee, H.S.** (2005) Sulfur Metabolism and Its Regulation. In L. Eggeling and M. Bott (Herausgeber) *Handbook of Corynebacterium glutamicum*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, USA. 351-371.

**Lee, H.S. and Hwang,B.J.** (2003) Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulphydrylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62** (5-6): 459-467.

**Leuchtenberger W.** (1996) Amino Acids - Technical Production and Use. In H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler and P. Stadler, (Herausgeber) *Biotechnology*, 6. Auflage. VCH, Weinheim, Germany. 465-502.

**Liebl, W., Klammer,R., and Schleifer,K.H.** (1989) Requirement of Chelating Compounds for the Growth of *Corynebacterium-Glutamicum* in Synthetic Media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32** (2): 205-210.

**Lüssling T., Muller K., Schreyer G., and Theissen F.** (1974) Patent: Verfahren zur Gewinnung von Methionin und Kaliumhydrogencarbonat aus den im Kreislauf geführten Mutterlaugen des Kaliumcarbonat-Methioninverfahrens. (DT 2421167 B2):

**McCarthy, T.E. and Sullivan,M.X.** (1941) A new and highly specific colorimetric test for methionine. *J. Biol. Chem.* **141** 871-876.

**Mondal, S. and Chatterjee, S.P.** (1994) Enhancement of methionine production by methionine analog ethionine resistant mutants of *Brevibacterium heali*. *Acta Biotechnologica* **14** (2): 199-204.

**Mondal, S., Das, Y., and Samanta, T.K.** (1990) L-Methionine production by *Nocardia polychromogenes* and *Brevibacterium ammoniagenes*. *Research and Industry* **35** 11-14.

**Mondal, S., Das, Y.B., and Chatterjee, S.P.** (1994a) Improvement of L-methionine production by double auxotrophic mutants of *Brevibacterium heali* Lt(5) and Lt(18). *Research and Industry* **39** (4): 239-241.

**Mondal, S., Das, Y.B., and Chatterjee, S.P.** (1994b) L-Methionine Production by Double Auxotrophic Mutants of A Ethionine Resistant Strain of *Brevibacterium heali*. *Acta Biotechnologica* **14** (1): 61-66.

**Moore, S., Spackman, D.H., and Stein, W.H.** (1958) Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins - An Improved System. *Analytical Chemistry* **30** (7): 1185-1190.

**Moore, S. and Stein, W.H.** (1948) Photometric Ninhydrin Method for Use in the Chromatography of Amino Acids. *Journal of Biological Chemistry* **176** (1): 367-388.

**Mueller J.H.** (1922) A new sulphur-containing amino acid isolated from casein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **19** 161-163.

**Nakayama, Kiyoshi, Sagamihara, Kanagawa, Araki, Kazumi, and Machida** (1971) Patent: Verfahren zur Herstellung von L-Methionin auf mikrobiologischem Wege. (DT 2105189):

**Newman, E.B., Budman, L.I., Chan, E.C., Greene, R.C., Lin, R.T., Woldringh, C.L., and D'Ari, R.** (1998) Lack of S-adenosylmethionine results in a cell division defect in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180** (14): 3614-3619.

**Ohnishi, J., Mitsuhashi, S., Hayashi, M., Ando, S., Yokoi, H., Ochiai, K., and Ikeda, M.** (2002) A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58** (2): 217-223.

**Pack, M.** (2004) Aminosäuren in der Tierernährung. *Elements: Degussa Science - Newsletter* 30-33.



- Park, S.D., Lee, J.Y., Kim, Y., Kim, J.H., and Lee, H.S.** (1998) Isolation and analysis of metA, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecules and Cells* **8** (3): 286-294.
- Pham, C.B., Galvez, F.C.F., and Padolina, W.G.** (1992) Methionine production by batch fermentation from various carbohydrates. *ASEAN food journal* **7** (1): 34-37.
- Pickering Laboratories** (2005) Amino Acid Analysis with Temperature and Eluent gradients. Method Abstract For Post-Column Liquid Chromatography 365 [MA-365-A]. *Pickering Laboratories: Method Abstract For Post-Column Liquid Chromatography* 1-2.
- Rey, D.A., Nentwich, S.S., Koch, D.J., Ruckert, C., Puhler, A., Tauch, A., and Kalinowski, J.** (2005) The McbR repressor modulated by the effector substance S-adenosylhomocysteine controls directly the transcription of a regulon involved in sulphur metabolism of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Molecular Microbiology* **56** (4): 871-887.
- Rossol, I. and Puhler, A.** (1992) The *Corynebacterium-Glutamicum* Acd Gene Encodes A C-S Lyase with Alpha-Beta-Elimination Activity That Degrades Aminoethylcysteine. *Journal of Bacteriology* **174** (9): 2968-2977.
- Roth, M.** (1971) Fluorescence Reaction for Amino Acids. *Analytical Chemistry* **43** (7): 880-882.
- Rückert C.** (2001) Genetische Analyse der Methionin Biosynthese in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Diplomarbeit); Universität Bielefeld.
- Sahm, H., Eggeling, L., and de Graaf, A.A.** (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biological Chemistry* **381** (9-10): 899-910.
- Sahm, H., Eggeling, L., Eikmanns, B., and Kramer, R.** (1995) Metabolic Design in Amino-Acid Producing Bacterium *Corynebacterium-Glutamicum*. *Fems Microbiology Reviews* **16** (2-3): 243-252.
- Sharma, S.** (2001) Strain improvement and reactor studies for the production of L-Methionine by *Corynebacterium lilium*. Dissertation. Indian Institute of Technology, Delhi (India).
- Stackebrandt E. and Woese C.R.** (1981) The evolution of prokaryotes. In M.J. Carlile, J.F. Collins and B.E.B. Moseley, (Herausgeber) *Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution*, Cambridge University Press, Cambridge. 1-31.

**Suzuki T., Honda H., and Katsumata R.** (1972) Production of antimicrobial compounds analogues to chloramphenicol by n-paraffin-grown bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **36** 2223-2228.

**Van Deemter** (1956) *Chem. Eng. Sci.* **5** 271-271.

**Wagner, H., Tanner,H., Liebetanz,E., Mannsfeld,S.P., and Pfeiffer,A.** (1969) Patent: Methionin Synthese nach dem Degussa-Verfahren. (DE1906405):

**Willke, T.** (1997) Reaktionskinetische und wachstumsphysiologische Untersuchungen an freien und immobilisierten Nitrifizierern. Braunschweig: Technische Universität, Dissertation. *Diss.* 1-235.

**Wöbbeking, C.** (2005) Entwicklung analytischer Methoden zum effizienten Screening methioninproduzierender Mikroorganismen. Diplomarbeit. Institut für Technologie der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (BFAL), Braunschweig.

**Wood, W.B.** (1966) Host Specificity of Dna Produced by Escherichia Coli - Bacterial Mutations Affecting Restriction and Modification of Dna. *Journal of Molecular Biology* **16** (1): 118-133.

**Yamada K., Kinoshita S., Tsunoda T., and Aida K.** (1972) The microbial production of amino acids. New York, Weinheim.

**Yamada, H., Morinaga,Y., and Tani,Y.** (1982) Formation of L-Methionine by Methanol-Utilizing Bacteria .1. L-Methionine Overproduction by Ethionine-Resistant Mutants of Obligate Methylophilic Strain Om33. *Agr. Biol. Chem.* **46** (1): 47-55.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Mikroskopische Aufnahme von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300	2
2	Liebig'sches Fass: Darstellung des Nährwertes von Sojabohnenmehl	4
3	Methionin-Biosynthese und Abbau durch Transmethylierungen in <i>C. glutamicum</i>	7
4	Komplexe Regulation der Methionin-Biosynthese in <i>C. glutamicum</i>	10
5	Methionin-Synthese nach dem Degussa-Verfahren 1	11
6	Methionin-Synthese nach dem Degussa-Verfahren 2	12
7	Mikroskopische Aufnahme von <i>E. coli</i> B834 in Medium 53	19
8	Beispielhafte Darstellung einer 96 well Platte	33
9	2-Platten bzw. 4-Platten-Thermo Shaker (Kisker, Steinfurt)	33
10	Korrelation zwischen dem Spektralphotometer PM 2 A von Zeiss und dem R 100 A Rekorder von Perkin-Elmer	36
11	Korrelation zwischen dem Spektralphotometer PM 2 A von Zeiss und dem Easy Reader EAR 400 AT (Tecan, Crailsheim)	36
12	Beispielhafte Kalibrierkurve 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung	39
13 a	Beispiel-Chromatogramm der gaschromatographischen Vermessung eines Standardgemisches aus je 100 µl SD1, SD2 und SD3 nach Derivatisierung mit dem EZ:faast-Kit	44
13 b	Beispiel-Chromatogramm der HPLC-Vermessung eines Aminosäurestandards	44
14	Mutation einer <i>C. glutamicum</i> Zellsuspension unter Einwirkung von UV- Licht mittels mobilem UV-Strahler	46
15	Überlebensrate einer DSM20300-Zellsuspension unter Einwirkung von UV-Strahlung	47
16	Mehrkanal-Pipetten-Höhenfixierungsschiene; Eigenbau Institut für Technologie (FAL Braunschweig)	49

Abbildung	Titel	Seite
17	Pickraster einer Agarplatte für die Selektion von Methionin-Analoga-resistenten Einzelkolonien	51
18	Feststellung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration von Methionin-Analoga mit Hilfe von Platten-Tests	52
19	Direkter Vergleich des Wachstums von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in 2 Minimalmedien (B74 und MM1) und einem Komplexmedium (53)	58
20	Einfluss von 3,4-Dihydroxybenzoesäure (DHB) auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in den Medien B74_gelb, B74_farblos und MM1_1_farblos in Abhängigkeit von der Maillard-Reaktion	60
21	Vergleich der Medien MM1_2, MM2 und MM2 bei Zugabe von Holzextrakt und 8 %iger Inokulation durch eine MM2-Vorkultur der Extinktion <sub>600</sub> von 4,5	62
22	Wachstumskurve von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in MM2_2	63
23	Korrelation zwischen der Extinktion <sub>600</sub> und der Biotrockenmasse (BTM) von <i>C. glutamicum</i> DSM 23000 in Medium MM2_2	65
24	Wachstumskurve von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in Medium 53	66
25	Korrelation zwischen der Extinktion <sub>600</sub> und der Biotrockenmasse (BTM) von <i>C. glutamicum</i> DSM 23000 in Medium 53	67
26	Kalibrierkurven 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung in MM1_2	69
27	Kalibrierkurve 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung in B74 mit Holz	69
28	Kalibrierkurve 1 und 2 zur Bradford-Proteinbestimmung in Medium 53	70
29	Proteingehalt der BTM [%] in <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp in Abhängigkeit vom Kulturmedium und der Ultraschall-Auflschlusszeit	71
30	GC-Vermessung von 1 g/l Standards der Methionin-Analoga DL-Ethionin, DL-Norleucin, DL-Methioninmethylsulfoniumchlorid und DL-Methioninsulfoxid in Wasser	77
31	Ablaufschema zur Adaptation von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp an die MA DL-Norleucin und DL-Ethionin	82
32	Selektion von Mutanten auf MA-Resistenz mit einem Plattentest	84
33	Pipettierschema für den Met-Nachweis im Reagenzglas-Maßstab	90
34	Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit der Korrelation der Extinktion <sub>600</sub> von <i>E. coli</i> B834 im	92

Abbildung	Titel	Seite
	Spektralphotometer Zeiss (Göttingen) mit der Met-Konzentration im 5 ml Gesamtansatz	
35	Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit einem 4 Wochen bei 4 °C gelagerten Inokulum	94
36	Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium mit einem 4 Wochen bei -20 °C gelagerten Inokulum	95
37	Linearer fit des Anfangsbereichs der Kalibrierkurve der Abb. 35 (S. 94) und 36 (S. 95)	96
38	Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium nach 6, 8 und 24 h 30 °C 300 rpm	97
39	Im Reagenzglas-Maßstab aufgenommene Kalibrierkurve in B74-Medium nach 8 h 30 °C 300 rpm (Ausschnitt aus Abb. 38, S. 97)	98
40	Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurve in B74-Medium mit der Korrelation der Extinktion <sub>550</sub> von <i>E. coli</i> B834 im Easy Reader (Tecan, Crailsheim) mit der Met-Konzentration im 200 µl Gesamtansatz je well	102
41	Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium der Reihen A-D und F-H nach 6, 7 und 8 h	103
42	Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium der Reihen A-D und F-H nach 8 h (Ausschnitt aus Abb. 41, S. 103)	104
43	Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium aus Platte A und B nach 6, 7 und 8 h bei Vermessung von Met-Standards von 0-200 mg/l	108
44	Platte A zeigt 8 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven in B74- Medium im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 7 h 35 °C und 1100 rpm	109
45	Platte B zeigt 8 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven in B74- Medium im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 7 h 35 °C und 1100 rpm	110
46	2 Mittelwert-Kalibrierkurven in MM1-Medium (Reihe A-D) und in	112

Abbildung	Titel	Seite
	MM1-Medium bei Zugabe von 5 % MOPS-Puffer (400 g/l) (Reihe E-H) im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 7 h 35 °C und 1100 rpm	
47	Versuch 1 zeigt 2 Mittelwert-Kalibrierkurven in MM2-Medium (Platte A und B) im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 8 h 35 °C und 1100 rpm	114
48	Versuch 2 zeigt 2 Mittelwert-Kalibrierungen in MM2-Medium (Platte A und B) im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 8 h 35 °C und 1100 rpm	115
49	2 Mittelwert-Kalibrierkurven in MM1-Medium einer Platte im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL (Kisker, Steinfurt) nach 6 und 7 h 35 °C und 1100 rpm	117
50	Regressionsgerade durch die Extinktionsmittelwerte im Bereich 0 – 30 mg/l Met in 90 % B74 + 5 % <i>E. coli</i> Inokulum + 5 % Met-Standard in verbrauchtem MM2-Medium bei einer Extinktion <sub>600</sub> von 7 und 8 und Inkubation von 6 h 35 °C 1100 rpm	120
51	Screening-Schema zur Selektion von Met-Überproduzenten	127
52	Derivatisierung primärer und sekundärer Aminosäuren mit Ninhydrin	130
53	Derivatisierung von primären Aminosäuren zu fluoreszierenden Isoindolderivaten	131
54	Schematischer Aufbau eines Nachsäulenderivatisierungssystems	131
55	Beispielchromatogramm einer GC-Vermessung von durch Isooctanol aus Silikonseptonen herausgelösten Siloxaneinheiten	134
56	Van Deemter Zusammenhang zwischen Bodenhöhe und Fließgeschwindigkeit (Van Deemter, 1956)	137
57	Aminosäurespektrum Wildtyp DSM 20300 bei Extinktion <sub>550</sub> 8,0	140
58	Aminosäurespektrum zweier Mutanten bei unterschiedlichen Extinktionen innerhalb der exponentiellen Phase des Wachstums_1	141
59	Aminosäurespektrum zweier Mutanten bei unterschiedlichen Extinktionen innerhalb der exponentiellen Phase des Wachstums_2	142
60	Aminosäurespektrum von 4 Mutanten in der stationären Phase des Wachstums Extinktion <sub>550</sub> von >10 einer 96 well Kultivierung in MM2_2	143

<b>Abbildung</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
61	Aminosäurespektrum des Wildtyps von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 im Verlauf einer im Kolben-Doppelansatz aufgenommenen Wachstumskurve	144
62	Wachstumskurve von <i>C. glutamicum</i> ATCC 21608 und <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp in MM2_2	145
63	Aminosäurespektrum von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp (WT) und ATCC 21608 zu zwei Messzeitpunkten einer im Kolben-Doppelansatz aufgenommenen Wachstumskurve in MM2_2	146
64	Wachstumskurve und Met-Bildung eines potenziellen industriellen Produktionsstammes für Met	147
65	Aminosäurespektrum eines potenziellen industriellen Produktionsstammes für Met in der späten exponentiellen Phase	149

## 9.2 Tabellenverzeichnis

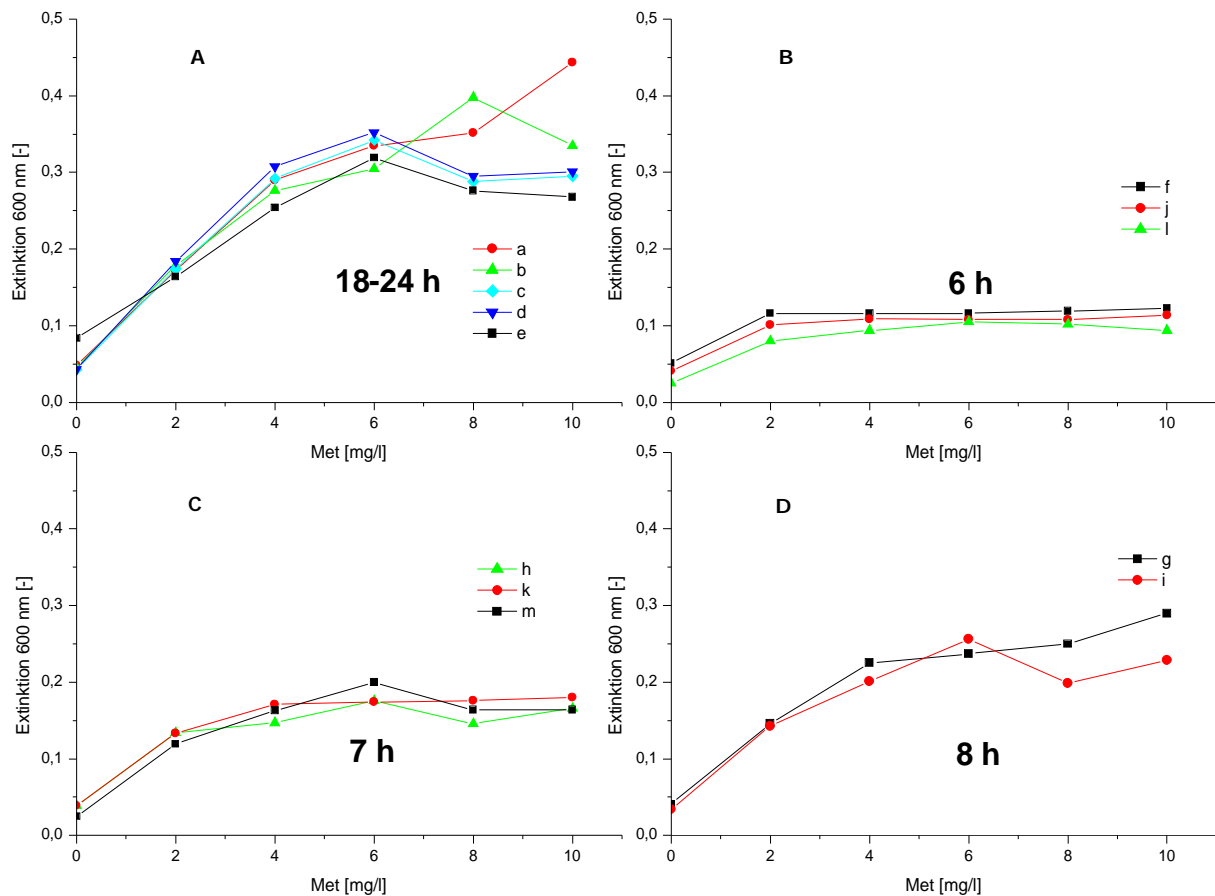
<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	S-Bilanzen einiger Medien in Publikationen zum Thema der mikrobiologischen Methionin-Produktion	17
2	Betriebsbedingungen des Gas-Chromatographen GC-17A (Shimadzu, Duisburg)	42
3	Überlebensrate der Zellen einer <i>C. glutamicum</i> DSM 20300-Zellsuspension in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsdauer bei einer Schichtdicke von 2 ml in einer 5 cm Petrischale und 15,4 cm Abstand zwischen UV-Röhre und Zellen	47
4	In dieser Arbeit eingesetzte Methionin-Analoga	50
5	Wachstum von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp in B74 Medium im Reagenzglas mit Rührkern und im 100 ml Schüttelkolben ohne Schikane	54
6	Einfluss von Holzextrakt auf das Wachstum von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 in den Medien 53, MM1_1 und B74	59
7	Proteingehalt der BTM [%] in Abhängigkeit vom Kulturmedium und der Ultraschall-Aufschlusszeit	70
8	Übersicht über die mit verschiedenen MA durchgeführten Pickversuche zur Bestimmung der MIK für <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp	75
9	Untersuchungen zur Hitzestabilität der in dieser Arbeit eingesetzten MA	78
10	Untersuchung des Einflusses von Methionin auf die Hemmwirkung von DL-Ethionin bzw. der Kombination von DL-Ethionin mit DL-Norleucin und 1,2,4-Triazol	80
11	Versuch der Adaptation des Wildtyps <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 an verschiedene Konzentrationen der Methionin-Analoga DL-Norleucin (NL) und DL-Ethionin (Eth)	81
12	Übersicht über die Verfügbarkeit und Kosten der eingesetzten Methionin-Analoga	85
13	Schematische Darstellung eines Reagenzglasansatzes mit 6x 4 Stellflächen; 2 Reihen wurden mit Reagenzgläsern steigender Met-Konzentration [mg/l] versehen	91
14	Übersicht über die Vermessung der Met-Endkonzentration im well von	105



<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
	1,5 mg/l (eingesetzte Stammlösung 30 mg/l Met) in 96 well Platten mit 2 Versuchsansätzen: 1) IKA-Minishaker mit 96 well Platten Aufsatz im Klimaschrank und 2) Einsatz eines PST-60 HL Thermoshakers	
15	Darstellung der Mittelwerte der Exinktionen im 6, 7 und 8 h Versuch der Aufnahme von Kalibrierkurven in B74-Medium im 2-Platten- Thermoshaker; 6-8 h 35 °C 1100 rpm	107
16	Drei Medien beim <i>E. coli</i> B834-Test im Vergleich; Leerwerte und maximale well zu well Unterschiede in der Extinktion <sub>550</sub> bei Vorlage von 90 % Medium + 5 % Inokulum + 5 % H <sub>2</sub> O und einer Inkubation von 6 h 35 °C 1100 rpm	113
17	<i>E. coli</i> Test mit 90 % MM1 + 5 % Inokulum + 5 % Met-Standard in MM2- Medium nach 6 und 7 h 35 °C 1100 rpm	116
18	<i>E. coli</i> Test mit 90 % B74 + 5 % <i>E. coli</i> Inokulum + 5 % Met-Standard in verbrauchtem MM2-Medium (Extinktion <sub>600</sub> von 7 und 8) nach 6 h 35 °C 1100 rpm	119
19	Schematische Darstellung einer 96 well Platte mit 190 µl eines Gemisches aus 85 % B74 – 10 % H <sub>2</sub> O, 5 % <i>E. coli</i> Inokulum und 5 % MM2 je well + 5 % Met-Standard bzw. zellfreier Überstand. Reihe A-D reihenweise Kalibrierkurven mit Standard-Konzentration 0, 2,5, 5, 10, 20 und 30 mg/l Met in H <sub>2</sub> O;Reihe E-H Wildtyp zellfrei Extinktion <sub>600</sub> von 7	122
20	Übersicht über die Mittelwert-Extinktionen des Versuchs aus Tab. 19	123
21	Wachstumsversuch von <i>C. glutamicum</i> DSM 20300 Wildtyp in MM2_2- Medium im 96 well Maßstab und Thermoshaker bei einer Schüttelfrequenz von 1100 rpm und verschiedenen Temperaturen	124

## 9.3 Kalibrierkurven und Tabellen *E. coli* B834

### 9.3.1 Kalibrierkurven im Reagenzglas-Maßstab

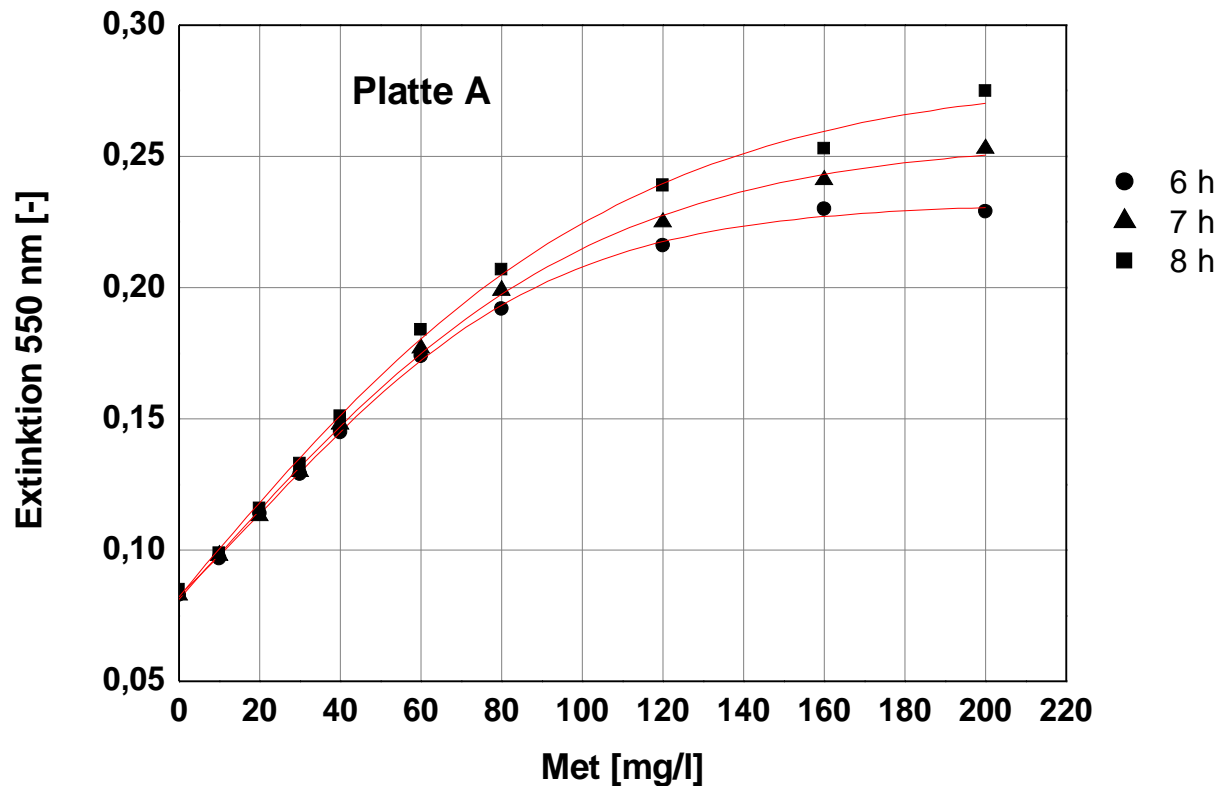


**Abb. 1:** Übersicht über die im Reagenzglas-Maßstab durchgeführten Versuche zur Optimierung der Kalibrierkurven in B74-Medium von *E. coli* B834 in Abhängigkeit von der Met-Konzentration

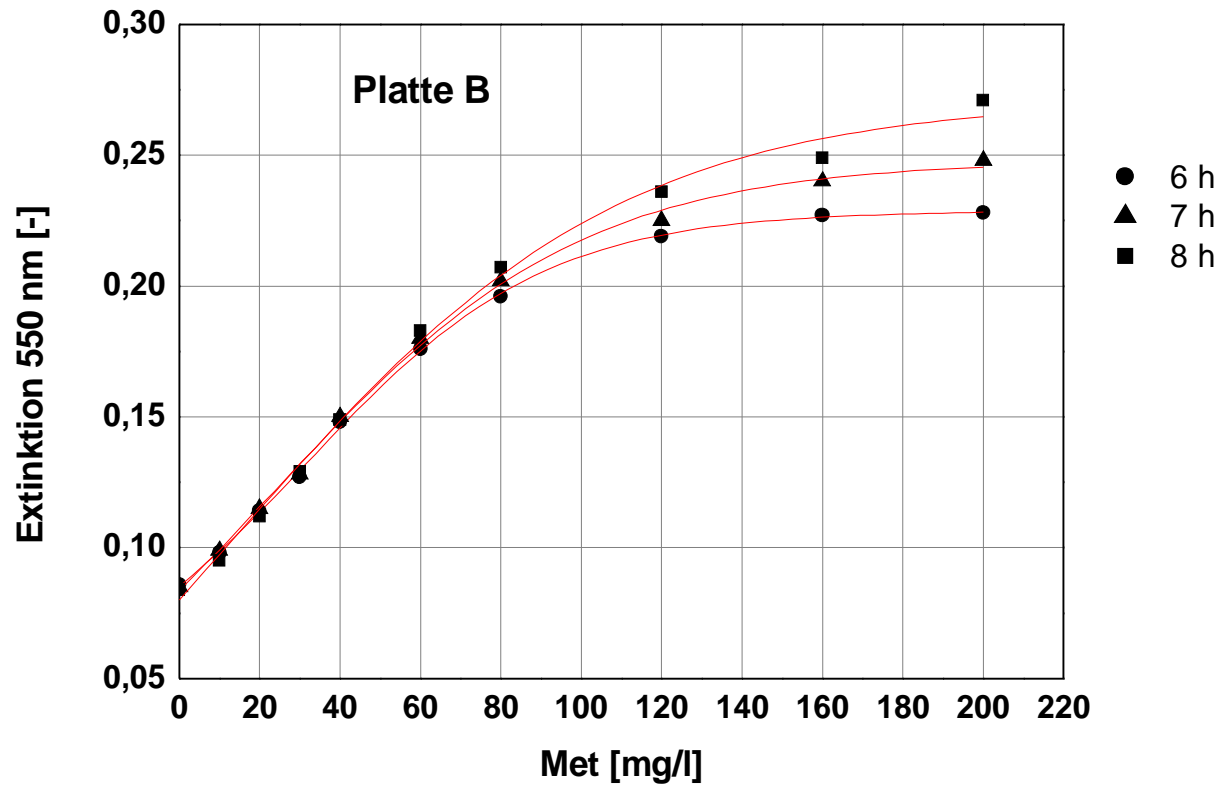
A) a = 24 h 30 °C 300 rpm; b = 24 h 30 °C 300 rpm; c = 19 h 25 °C 300 rpm; d = 24 h 30 °C 300 rpm; e = 18 h 20 °C 300 rpm; B) f = 6 h 30 °C 300 rpm; g = 6 h 30 °C 400 rpm; h = 6 h 37 °C 400 rpm; C) i = 7 h 30 °C 300 rpm; j = 7 h 30 °C 400 rpm; k = 7 h 37 °C 400 rpm; D) l = 8 h 30 °C 300 rpm; m = 8 h 30 °C 300 rpm

### 9.3.2 Kalibrierkurven und Tabellen im 96 well-Maßstab

#### 9.3.2.a B74-Medium



**Abb. 2:** Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium in **Platte A** nach 6, 7 und 8 h mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader mit der Met-Konzentration; eingesetzte Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 = 1000 mg/l und 12 = 0 mg/l Met. Die Konzentration 1000 mg/l ist in der Abbildung nicht gezeigt. Inkubation 6-8 h 35 °C 1100 rpm im 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL; die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.



**Abb. 3:** Im 96 well Platten Maßstab aufgenommene Mittelwert-Kalibrierkurven in B74-Medium in **Platte B** nach 6, 7 und 8 h mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader mit der Met-Konzentration!; eingesetzte Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 = 1000 mg/l und 12 = 0 mg/l Met. Die Konzentration 1000 mg/l ist in der Abbildung nicht gezeigt. Inkubation 6-8 h 35 °C 1100 rpm im 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL; die Extinktionsmittelwerte wurden mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung gefittet.

**Tab. 1: Platte A** Extinktionsmessung<sub>550</sub> im Easy Reader nach **6 h 35 °C** 1100 rpm 2-Platten-Thermoshaker; *E. coli* B834 Test zum Met-Nachweis; Spalte 1-12 mit folgenden Met-Konzentrationen: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,077	0,088	0,110	0,122	0,139	0,167	0,185	0,215	0,219	0,219	0,225	0,074
B	0,081	0,095	0,108	0,129	0,144	0,172	0,19	0,214	0,227	0,218	0,231	0,079
C	0,081	0,095	0,11	0,128	0,144	0,171	0,19	0,213	0,23	0,23	0,234	0,076
D	0,078	0,092	0,107	0,124	0,141	0,169	0,19	0,217	0,227	0,23	0,232	0,076
E	0,079	0,092	0,107	0,124	0,139	0,174	0,19	0,21	0,228	0,228	0,23	0,076
F	0,085	0,099	0,114	0,13	0,145	0,176	0,193	0,215	0,234	0,235	0,223	0,081
G	0,092	0,103	0,119	0,137	0,153	0,179	0,201	0,223	0,242	0,225	0,242	0,085
H	0,097	0,108	0,124	0,14	0,156	0,186	0,193	0,224	0,23	0,244	0,244	0,098
$\bar{x}$	0,084	0,097	0,112	0,129	0,145	0,174	0,192	0,216	0,230	0,229	0,233	0,081

**Tab. 2: Platte A** Extinktionsmessung<sub>550</sub> im Easy Reader nach **7 h 35 °C** 1100 rpm 2-Platten-Thermoshaker; *E. coli* B834 Test zum Met-Nachweis; Spalte 1-12 mit folgenden Met-Konzentrationen: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,078	0,09	0,112	0,123	0,143	0,173	0,193	0,224	0,232	0,244	0,251	0,075
B	0,082	0,098	0,108	0,13	0,146	0,177	0,199	0,223	0,239	0,243	0,256	0,082
C	0,083	0,096	0,111	0,131	0,148	0,176	0,197	0,222	0,241	0,255	0,259	0,077
D	0,079	0,094	0,109	0,125	0,143	0,172	0,197	0,227	0,238	0,254	0,257	0,076
E	0,079	0,094	0,108	0,124	0,141	0,171	0,197	0,219	0,238	0,255	0,252	0,077
F	0,085	0,099	0,114	0,129	0,149	0,178	0,199	0,224	0,243	0,258	0,246	0,082
G	0,092	0,104	0,119	0,137	0,155	0,183	0,207	0,232	0,251	0,247	0,267	0,085
H	0,105	0,106	0,124	0,139	0,156	0,187	0,199	0,232	0,242	0,267	0,27	0,098
$\bar{x}$	0,085	0,098	0,113	0,130	0,148	0,177	0,199	0,225	0,241	0,253	0,257	0,082

**Tab. 3: Platte A** Extinktionsmessung<sub>550</sub> im Easy Reader nach **8 h 35 °C** 1100 rpm 2-Platten-Thermoshaker; *E. coli* B834 Test zum Met-Nachweis; Spalte 1-12 mit folgenden Met-Konzentrationen: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,077	0,09	0,114	0,126	0,144	0,178	0,2	0,235	0,242	0,265	0,274	0,076
B	0,081	0,097	0,111	0,131	0,148	0,181	0,204	0,234	0,252	0,268	0,281	0,08
C	0,082	0,096	0,111	0,131	0,149	0,182	0,204	0,236	0,252	0,274	0,284	0,078
D	0,078	0,094	0,108	0,127	0,146	0,178	0,204	0,239	0,249	0,275	0,281	0,077
E	0,08	0,095	0,11	0,127	0,145	0,179	0,207	0,232	0,251	0,273	0,278	0,078
F	0,088	0,102	0,119	0,135	0,154	0,188	0,211	0,239	0,258	0,282	0,273	0,086
G	0,094	0,106	0,123	0,142	0,161	0,192	0,218	0,246	0,266	0,276	0,292	0,09
H	0,1	0,111	0,129	0,147	0,163	0,197	0,21	0,248	0,255	0,288	0,296	0,103
$\bar{x}$	0,085	0,099	0,116	0,133	0,151	0,184	0,207	0,239	0,253	0,275	0,282	0,084

**Tab. 4: Platte B** Extinktionsmessung<sub>550</sub> im Easy Reader nach **6 h 35 °C** 1100 rpm 2-Platten-Thermoshaker; *E. coli* B834 Test zum Met-Nachweis; Spalte 1-12 mit folgenden Met-Konzentrationen: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,077	0,087	0,103	0,123	0,137	0,165	0,187	0,213	0,213	0,214	0,231	0,078
B	0,076	0,093	0,107	0,123	0,14	0,171	0,188	0,213	0,223	0,226	0,227	0,079
C	0,078	0,092	0,108	0,126	0,142	0,17	0,192	0,213	0,224	0,224	0,217	0,08
D	0,076	0,091	0,107	0,124	0,141	0,168	0,19	0,217	0,222	0,225	0,227	0,079
E	0,081	0,094	0,11	0,126	0,143	0,17	0,194	0,213	0,225	0,228	0,23	0,081
F	0,09	0,106	0,122	0,139	0,154	0,184	0,199	0,218	0,227	0,232	0,227	0,094
G	0,096	0,108	0,125	0,143	0,16	0,185	0,207	0,228	0,24	0,23	0,285	0,094
H	0,104	0,114	0,132	0,15	0,165	0,194	0,212	0,235	0,244	0,247	0,243	0,108
$\bar{x}$	0,085	0,098	0,114	0,132	0,148	0,176	0,196	0,219	0,227	0,228	0,236	0,087

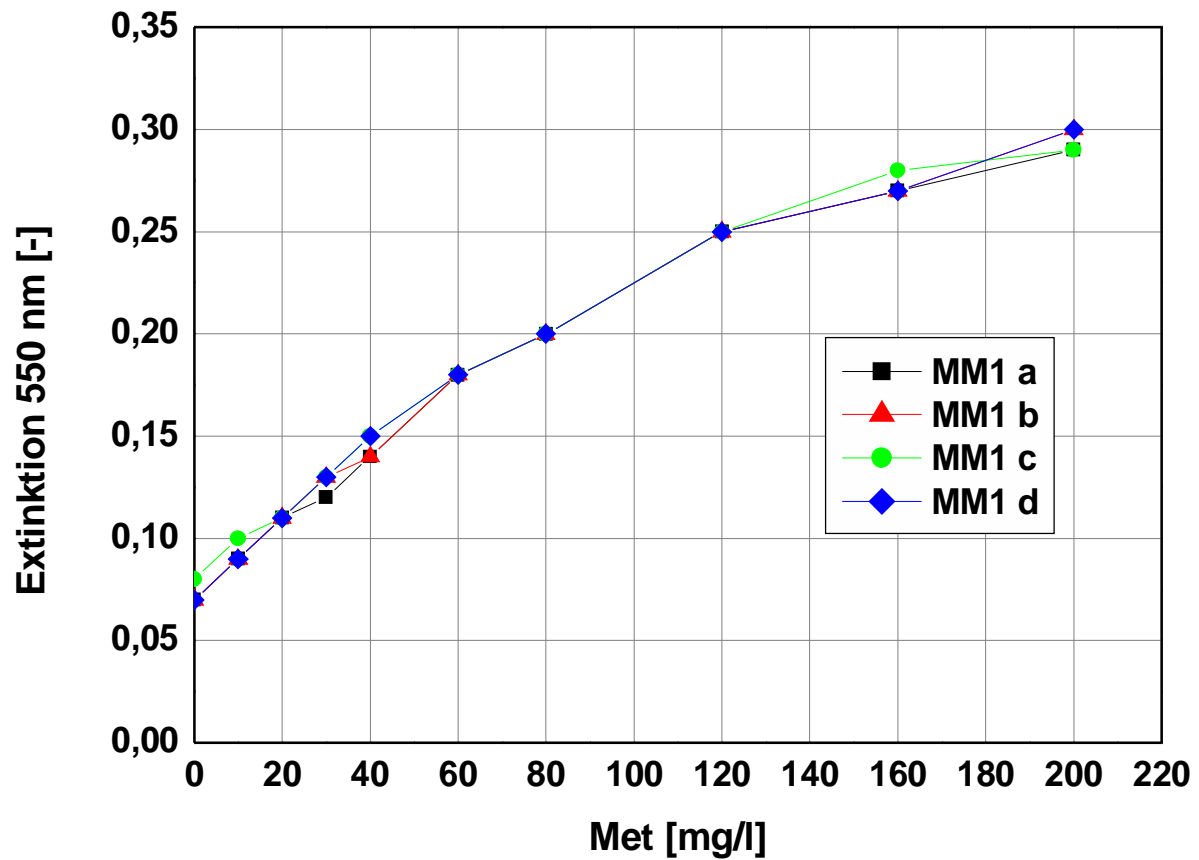
**Tab. 5: Platte B** Extinktionsmessung<sub>550</sub> im Easy Reader nach **7 h 35 °C** 1100 rpm 2-Platten-Thermoshaker; *E. coli* B834 Test zum Met-Nachweis; Spalte 1-12 mit folgenden Met-Konzentrationen: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,079	0,09	0,106	0,124	0,141	0,172	0,196	0,22	0,229	0,235	0,249	0,077
B	0,079	0,096	0,11	0,125	0,144	0,177	0,197	0,222	0,239	0,247	0,251	0,079
C	0,082	0,095	0,11	0,128	0,145	0,176	0,2	0,221	0,238	0,246	0,241	0,079
D	0,079	0,092	0,108	0,125	0,143	0,173	0,197	0,225	0,235	0,246	0,248	0,078
E	0,082	0,095	0,11	0,128	0,145	0,174	0,199	0,22	0,236	0,248	0,249	0,079
F	0,091	0,106	0,121	0,137	0,154	0,184	0,203	0,222	0,241	0,248	0,244	0,089
G	0,096	0,107	0,124	0,143	0,16	0,188	0,212	0,232	0,251	0,248	0,281	0,09
H	0,102	0,113	0,13	0,148	0,164	0,195	0,213	0,239	0,254	0,262	0,262	0,104
$\bar{x}$	0,086	0,099	0,115	0,132	0,150	0,180	0,202	0,225	0,240	0,248	0,253	0,084

**Tab. 6: Platte B** Extinktionsmessung<sub>550</sub> im Easy Reader nach **8 h 35 °C** 1100 rpm 2-Platten-Thermoshaker; *E. coli* B834 Test zum Met-Nachweis; Spalte 1-12 mit folgenden Met-Konzentrationen: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 120, 160, 200, 1000 und 0 mg/l Met

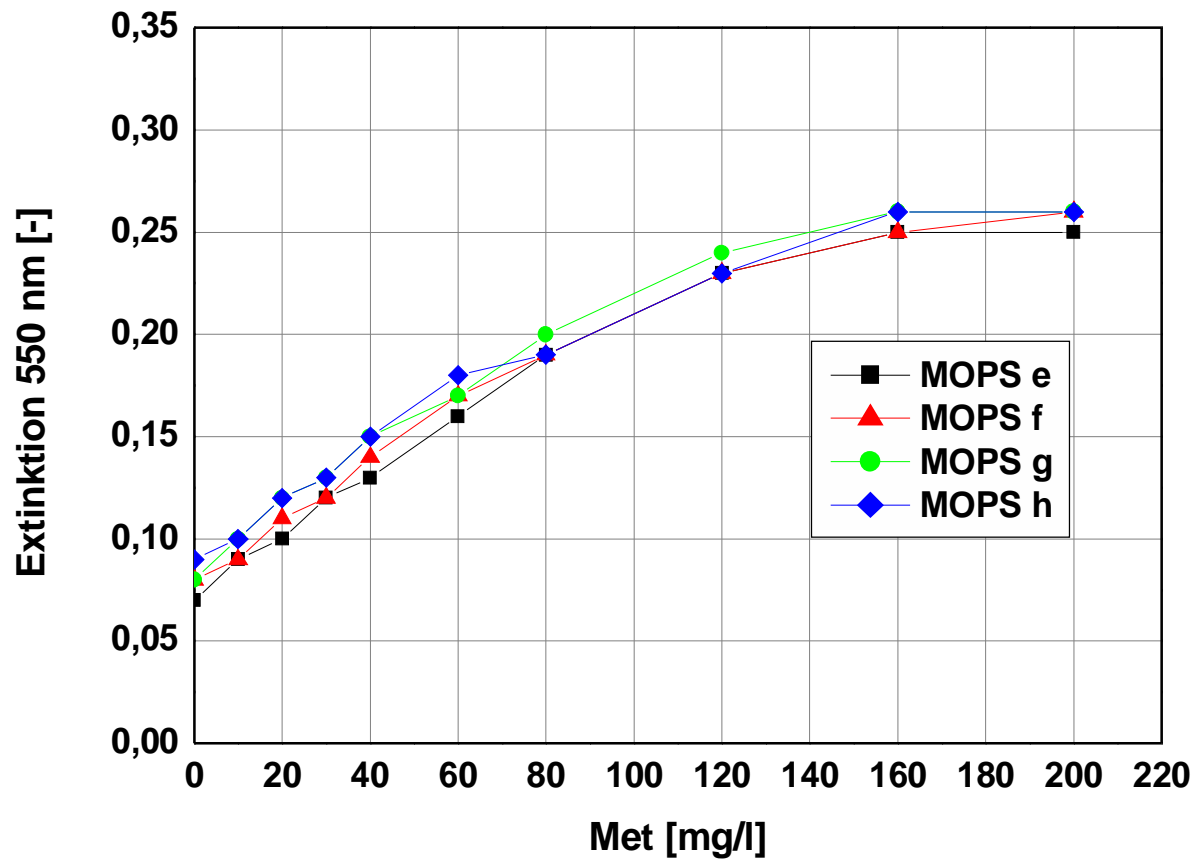
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,076	0,088	0,106	0,123	0,143	0,177	0,202	0,232	0,239	0,259	0,271	0,08
B	0,079	0,095	0,11	0,126	0,146	0,182	0,206	0,237	0,251	0,275	0,278	0,085
C	0,081	0,095	0,11	0,129	0,147	0,182	0,209	0,235	0,25	0,271	0,269	0,085
D	0,077	0,091	0,109	0,125	0,145	0,179	0,205	0,238	0,246	0,272	0,274	0,08
E	0,076	0,091	0,108	0,125	0,145	0,177	0,204	0,23	0,245	0,27	0,274	0,081
F	0,081	0,098	0,114	0,131	0,149	0,182	0,204	0,229	0,246	0,266	0,263	0,087
G	0,089	0,101	0,119	0,137	0,158	0,191	0,215	0,241	0,257	0,271	0,313	0,09
H	0,093	0,104	0,123	0,139	0,159	0,194	0,213	0,243	0,258	0,282	0,29	0,103
$\bar{x}$	0,082	0,095	0,112	0,129	0,149	0,183	0,207	0,236	0,249	0,271	0,279	0,086

### 9.3.2.b MM1-Medium



**Abb. 4:** 4 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven (Reihe A-D) in **MM1-Medium** im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL nach 7 h 35 °C und 1100 rpm mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader mit der Met-Konzentration; eingesetzte Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 und 12 = 0 mg/l Met.





**Abb. 5:** 4 reihenweise aufgenommene Kalibrierkurven (Reihe E-H) in **MM1-Medium bei Zugabe von 5 % MOPS-Puffer (400 g/l)** im 96 well Platten Maßstab 2-Platten-Thermoshaker PST-60 HL nach 7 h 35 °C und 1100 rpm mit der Korrelation der Extinktion<sub>550</sub> von *E. coli* B834 im Easy Reader mit der Met-Konzentration; eingesetzte Met-Standards in Spalte 1 = 0 mg/l, 2 = 10 mg/l, 3 = 20 mg/l, 4 = 30 mg/l, 5 = 40 mg/l, 6 = 60 mg/l, 7 = 80 mg/l, 8 = 120 mg/l, 9 = 160 mg/l, 10 = 200 mg/l, 11 und 12 = 0 mg/l Met.

## Lebenslauf

**Tanja Hartwich**  
**Wetzleberstr. 9**  
**38322 Hedeper**

Persönliche Daten	Geburtsdatum	18.02.1977
	Familienstand	verheiratet
	Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulausbildung	08/1983-07/1987	Grundschule Remlingen
	08/1987-07/1989	Orientierungsstufe Wolfenbüttel-Linden
	09/1989-05/1996	Gymnasium im Schloss Wolfenbüttel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung	10/1996-08/1998	FH für Verwaltung und Rechtspflege FB Polizei Gehobener Polizeivollzugsdienst des Landes Niedersachsen
	09/1998-12/1998	Ausbildung Reiseverkehrskauffrau Reisebüro Schmidt Wolfenbüttel
Studium	10/1999-01/2005	Studium der Biologie (Dipl.) TU Braunschweig Abschluss: Diplom der Biologie
Studienbegleitende Tätigkeiten	03/2002-12/2002	Wissenschaftl. Hilfskraft DSMZ Stöckheim
	04/2004-12/2004	Diplomarbeit DSMZ Stöckheim Thema: Etablierung der MLVA zur Charakterisierung von <i>Staphylococcus</i> - Stämmen
	07/2004-12/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft DSMZ Stöckheim
Beruflicher Werdegang	02/2005-07/2007	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der FAL (Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft in Braunschweig) im Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Doktorarbeit mit dem Thema: Untersuchungen zur biotechnischen Methionin-Produktion in <i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i> ATCC 13032
	ab 09/2007	Elternzeit; Geburt meines Sohnes 09/2007
	05/2008	Mündliche Prüfung (Disputation)
	Voraussichtlich 06/2008	Abschluss: Dr. rer. nat. (TU-Braunschweig)